

形態形成及び成長促進活性を有する新規化学物質

5 技術分野

本発明は、微生物が生産する新規ビタミン様作用物質ならびにその製造法及び用途に関するものである。

背景技術

- (10) これまでアオサ、ヒトエグサ等の大型緑藻類の既存の合成培地を用いた室内培養では、純化するに従いカルス状又は単細胞状に藻体が崩れる現象がみられることが知られている (L. Provasoli; *Ulva. Biol. Bull.*, 1958, 114, 375.; M. Tatewaki, L. Provasoli and I. J. Pintner; *J. Phycol.*, 1983, 19, 409.)。また、このように形態を失った藻体に生海水や土壌抽出液、紅藻抽出液、褐藻抽出液、又はある種の海洋由来の微生物培養液を添加すると、葉状体回復や成長速度の増大が起こることが知られている (M. Tatewaki, L. Provasoli and I. J. Pintner; *J. Phycol.*, 1983, 19, 409.) が、それらの抽出液の有効成分、ビタミン様作用物質は見いだされていない。そのため、室内におけるアオサ、ヒトエグサ等の大型緑藻類の無菌培養細胞を用いた長期的な生理・生態研究、培養保存が
15
20 困難であった。

発明の開示

- 海洋性大型緑藻類をすべての成分が既知である培地のみを使って無菌的に長期間培養することができれば、対象藻類の生理・生態研究のほかに養殖種である食用ヒトエグサ類の種苗生産や維持・管理、緑藻類の種の保存など実用的な培養手法として確立することができる。すでに本発明者はこのような観点から海洋性大型緑藻類の形態形成、成長促進を誘引する微生物を見出している (特願 2001-396342)。しかし、その微生物が生産する有効成分、ビタミン様作用物質は未知のままであった。
- 25

本発明はこのような新規ビタミン様作用物質を提供することを目的とする。

本発明者は、かかる事情を鑑み、新規な有効成分の探索を行い、その結果 YM-2-23 株（受託番号 FERM BP-8417 で、2001 年 8 月 20 日付（原寄託）で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に寄託されている（2003 年 6 月 25 日付で原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求受領）、テナシバキュラム・スピーシーズ (*Tenacibaculum* sp.) YM-1-69（受託番号 FERM BP-8418 で、2001 年 8 月 20 日付（原寄託）で独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6）に寄託されている（2003 年 6 月 25 日付で原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求受領）、及びそれらの類似菌株の培養液から極めて強い活性を有する活性物質を単離し、またその化合物が新規物質であることを見出し、本発明を完成した。これまで YM-2-23 株及び／又は YM-1-69 株に類似するフラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、ゾベリア (*Zobellia*) 属又はテナシバキュラム (*Tenacibaculum*) 属の産生する物質としてはリコペン、ゼアキサンチン等のカロテノイド類縁体が報告されているが、大型藻類の成長を促進する、あるいは形態をコントロールするような化合物の単離例はなく、世界で初めての報告となる。

すなわち、本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 下記の理化学的性質：

20 1. 物質の色：無色

2. 分子量：457

3. 分子式： $C_{24}H_{31}N_3O_4S$

質量分析：FABMS： m/z 456 $[M-H]^-$ (図 1)

高分解能質量分析：実測値 456.1960 $[M-H]^-$

25 計算値 456.1930 ($C_{24}H_{30}N_3O_4S$)

4. 核磁気共鳴シグナル：

1) 1H -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、750 MHz)：(図 2)

δ ppm 0.818 (3H, s), 0.837 (3H, s), 0.882 (3H, s), 0.960 (1H, m), 1.058 (1H, m), 1.167 (1H, m), 1.326 (3H, s), 1.37 (1H, m), 1.38 (1H, m), 1.40 (1H, m),

1.58 (1H, m), 1.61 (2H, m), 1.52 (1H, br d, J = 13 Hz), 1.76 (1H, br d, J = 14 Hz), 2.024 (1H, m), 2.181 (1H, dd, J = 4, 14 Hz), 2.291 (1H, dd, J = 14, 16.5 Hz), 7.698 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.845 (1H, d, J = 7.5 Hz)

2) ^{13}C -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、125 MHz): (図3)

5 δ ppm 15.236 (q), 19.037 (t), 20.287 (t), 20.955 (q), 21.835 (q), 25.987 (t), 33.381 (s), 33.636 (q), 37.308 (s), 39.590 (t), 41.199 (t), 42.346 (t), 52.769 (d), 56.381 (d), 79.096 (s), 114.965 (s), 124.399 (d), 139.004 (s), 141.232 (d), 150.282 (s), 152.656 (s), 172.081 (s), 173.538 (s), 174.661 (s)

を有する新規化学物質 1。

(10 (2) 下記の理化学的性質:

1. 物質の色: 無色

2. 核磁気共鳴シグナル:

^1H -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、500 MHz): (図4)

15 δ ppm 0.815 (3H, s), 0.834 (3H, s), 0.877 (3H, s), 0.949 (1H, m), 1.048 (1H, m), 1.163 (1H, m), 1.297 (3H, s), 1.35 - 1.40 (3H, m), 1.52 - 1.63 (4H, m), 1.753 (1H, br d, J = 14 Hz), 2.012 (1H, m), 2.158 (1H, m), 2.299 (1H, m), 7.646 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.769 (1H, d, J = 8.0 Hz)

を有する新規化学物質 2。

(20 (3) 前記(1)に記載の新規化学物質 1 又は前記(2)に記載の新規化学物質 2 を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に新規化学物質 1 又は 2 を生成蓄積させ、該生成蓄積した新規化学物質 1 又は 2 を採取することを特徴とする新規化学物質 1 又は 2 の製造法。

(4) 微生物が YM-2-23 株 (FERM BP-8417)、テナシバキュラム・スピーシーズ (*Tenacibaculum* sp.) YM-1-69 (FERM BP-8418) 又はそれらの類似菌株である前記
25 (3) に記載の製造法。

(5) 前記(1)に記載の新規化学物質 1 又は前記(2)に記載の新規化学物質 2 を有効成分として含有する藻類培養用培地。

(6) 前記(1)に記載の新規化学物質 1 をトリメチルシリルジアゾメタンで処理することにより得られる該新規化学物質 1 のモノメチル化体、ジメチル化体又

はトリメチル化体。

(7) 前記(6)に記載のトリメチル化体を水素化ホウ素ナトリウムで処理することにより得られる化合物又はその誘導体。

以下、本発明を詳細に説明する。

- 5 本発明の新規化学物質 1 及び 2 は、微生物を用いて生産することが可能である。本発明の化学物質の製造に用いる微生物としては、該化学物質の生産能を有する微生物であれば特に限定されず、例えば、フラボバクテリウム属、ゾベリア属、テナシバキュラム属等の Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodes complex に属する菌株や、これらの菌株に由来する変異株を挙げることができる。具体的には、
- 10 YM-2-23 株 (FERM BP-8417)、テナシバキュラム・スピーシーズ (Tenacibaculum sp.) YM-1-69 (FERM BP-8418) や、これらの菌株に由来する変異株を挙げることができる。YM-1-69 株や YM-2-23 株の代わりに、これらの菌株の類似菌株を使用してもよい。「YM-1-69 株の類似菌株」には、例えば、海洋性大型緑藻類に対し葉状体形成活性又は生長促進活性を示す菌株であって、配列番号 1 記載の塩基配列と 85%
- 15 以上、好ましくは 95% 以上相同な塩基配列で表される 16S rRNA V3 領域遺伝子を持つ菌株や配列番号 3 記載の塩基配列と 72% 以上、好ましくは 95% 以上相同な塩基配列で表される *gyrB* 遺伝子を持つ菌株が含まれる。「YM-2-23 株の類似菌株」には、例えば、海洋性大型緑藻類に対し葉状体形成活性又は生長促進活性を示す菌株であって、配列番号 2 記載の塩基配列と 85% 以上、好ましくは 95% 以上相同
- 20 な塩基配列で表される 16S rRNA V3 領域遺伝子を持つ菌株や配列番号 4 記載の塩基配列と 72% 以上、好ましくは 80% 以上、更に好ましくは 95% 以上相同な塩基配列で表される *gyrB* 遺伝子を持つ菌株が含まれる。

- 「YM-1-69 株の類似菌株」及び「YM-2-23 株の類似菌株」としては、例えば YM2-10 (MBIC 04671)、YM2-11 (MBIC 04672)、YM2-12 (MBIC 04673)、YM2-13 (MBIC 04674)、
- 25 YM1-66 (MBIC 04663)、YM2-24 (MBIC 04684)、YM1-51 (MBIC 04662)、Zobellia uliginosa (ATCC 14397)、YM1-11 (MBIC 04693)、T-588 (MBIC 05930)、YM2-22 (MBIC 04682)、YM2-27 (MBIC 04687)、YM2-6 (MBIC 04669)、YM1-68 (MBIC 04664)、YM1-38 (MBIC 04661)、YM2-4 (MBIC 04667)、YM2-5 (MBIC 04668)、YM2-7 (MBIC 04670)、YM2-21 (MBIC 04681)、YM2-1 (MBIC 04666)、T-565 (MBIC 05877)、T-424 (MBIC 05876)、

[Cytophaga] sp. UP7 (MBIC 01484)、T-551 (MBIC 05929)、Pedobacter heparinus (IFO 12017)、T-561 (MBIC 05879)、Cyclobacterium marinum (LMG 13164)、Cytophaga sp. (MBIC 01539)、Cytophaga sp. (MBIC 01599)、Chitinophaga pinensis (DSM 2588) が挙げられる。

- 5 前記の菌株のうち、「MBIC」が付された菌株は、海洋バイオテクノロジー研究所カルチャーコレクション (Marine Biotechnology Institute Culture collection; MBIC) (日本国岩手県釜石市平田 3 - 7 5 - 1) (<http://seasquirt.mbio.co.jp/mbic/index.php?page=top>) から、「IFO」が付された菌株は、財団法人発酵研究所 (Institute for Fermentation, Osaka; IFO) (日本国大阪府
10 大阪市淀川区十三本町 2 丁目 1 7 番 8 5 号) から、「ATCC」が付された菌株は、アメリカン タイプ カルチャー コレクション (American Type Culture Collection; ATCC) (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, U. S. A.) から、「DSM」が付された菌株は、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany) から、「LMG」
15 が付された菌株は、BCCM™/LMG Bateria Collection (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (RUG), K. L. Ledegancksfaat 35, B-9000 Gent, Brussels, Belgium) から、それぞれ入手可能である。

- (16S rRNA V3 領域遺伝子及び／又は gyrB 遺伝子の塩基配列が YM-1-69 株や
20 YM-2-23 株のそれと同一である菌株は、これらの類似菌株の中でも特に好ましい菌株である。

前記の微生物の培養に際しては、通常海洋細菌の培養方法が一般に用いられる。培地としては資化可能な炭素源、窒素源、無機物などを程よく含有する培地であれば合成培地、天然培地のいずれでも使用可能である。

- 25 炭素源としては、グルコース、澱粉、デキストリン、マンノース、フルクトース、シュクロース、ラクトース、キシロース、アラビノース、マンニトール、糖蜜などが単独又は組合せて用いられる。更に、菌の資化能によっては炭化水素、アルコール類、有機酸なども用いられる。

窒素源としては、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、

硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチープ・リカー、大豆粉、カザミノ酸などが単独又は組合せて用いられる。

そのほか、必要に応じて塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸二水素カリウム、リン酸マグネシウム・8水塩、硫酸第一鉄、塩化カルシウム、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸銅などの無機塩類を加える。

更に、使用菌の生育や本発明の化学物質の生産を促進する微量成分（例えば糖類、アミノ酸、無機塩類など）を適当に添加することができる。

培養法としては、液体培養が最も効率よく、培養温度は 30℃ 程度が適当であり、
10 培地の pH は、通常 7~9、好ましくは 7.5~8 である。培地の pH 調整には水酸化ナトリウム水溶液や塩酸などが用いられる。

液体培養で 1~4 日間培養を行うと、新規化学物質 1 又は 2 が培養液中及び菌体中に生成蓄積される。培養物中の生成量が最大に達したときに培養を停止することが好ましい。特に、培養 3 日後がもっとも好ましい。

15 培養物から新規化学物質 1 又は 2 を単離精製するに際しては、微生物代謝産物をその培養物から単離精製するために常用される方法に従って行われる。例えば、培養物を濾過や遠心分離により培養濾液と菌体に分け、菌体を含水メタノール、含水アセトニトリルなどで抽出する。次いで、抽出液から有機溶媒をロータリーエバポレーター等で減圧除去し、この抽出液と培養濾液とをあわせてポリスチレン系吸着剤（例えばスチレンジビニルベンゼンポリマー）などに吸着させる。吸着した活性物質を水洗して脱塩し、含水メタノール、含水アセトニトリルなどで活性物質を溶出する。溶出液を凍結乾燥などで減圧濃縮し、スチレンジビニルベンゼン系ポリマー、陰イオン交換樹脂によるイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどにより、新規化学
20 物質 1 又は 2 を得る。新規化学物質 2 は極めて不安定な化合物であるが、新規化学物質 2 を水酸化ナトリウム水溶液やアンモニア水などの強アルカリ水溶液中におくことにより、徐々に新規化学物質 1 に変化する。新規化学物質 1 は極めて安定な化合物である。

新規化学物質 1 を適当なメチル化剤（例えば、トリメチルシリルジアゾメタン）

で処理することにより、新規化学物質 1 のモノメチル化体、ジメチル化体又はトリメチル化体を得ることができる。トリメチルシリルジアゾメタンの新規化学物質 1 に対するモル比を調節したり、反応条件の選択（例えば、反応温度や pH の設定、ジメチルアミノスルファートリフルオリド (DAST) の存在下で反応）により、

5 モノメチル化体、ジメチル化体又はトリメチル化体を選択的に得ることができる。

更に、前記トリメチル化体を水素化ホウ素ナトリウムで処理することにより、後述する理化学的性質を有する Me_1H_3 を得ることができる。また、反応溶媒の極性、反応温度を変えることにより Me_1H_3 よりも更に還元された化合物 Me_1H_1 を得ることができる。また、 Me_1H_1 を強アルカリ条件下、式： RI
10 （ここで、 R は炭素数 1 ～ 6 のアルキル基を表す。）で示されるヨウ化アルキル（例えば、ヨウ化メチル）を作用させることによりメチル化体 Me_1H_1Me 等のアルキル化体を得ることができる。これらの反応と、得られる生成物の情報は新規化学物質 1 及び 2 を特定する場合等に有益である。

本発明の新規化学物質 1 及び 2 は、藻類培養用培地の有効成分として有用である。
15 新規化学物質 1 及び 2 は、単独で用いても、また両者を併用してもよい。

前記藻類培養用培地の適用対象となる藻類としては、好ましくは海洋性大型緑藻類が挙げられる。海洋性大型緑藻類としては、アオサ (ULVALES) 目の海藻で、例えば、ヒトエグサ科 (Monostromataceae)、アオサ科 (Ulvaceae) などの緑藻を挙げることができる。具体的にはヒトエグサ科に属する海藻としてヒトエグサ属
20 ヒトエグサ (Monostroma nitidum)、同属マキヒトエ (Monostroma oxyspermum)、同属エゾヒトエグサ (Monostroma angicava)、アオサ科に属する海藻としてアオノリ属ヒラアオノリ (Enteromorpha compressa)、同属ボウアオノリ (Enteromorpha intestinalis)、同属ウスバアオノリ (Enteromorpha linza)、アオサ属ボタンアオサ (Ulva conglobata)、同属アナアオサ (Ulva pertusa) などを例示すること
25 ができる。

海洋性大型緑藻類の培養に使用する培地は、有効成分である新規化学物質 1 及び／又は 2 を含むこと以外は、従来の培養方法（海洋性大型緑藻類が単細胞化してしまう培養方法）で使用されていたものと同様でよく、例えば、ASP7 培地、PES 培地、PESI 培地など、又は単に滅菌済みの海水を使用することができる。培地中

における新規化学物質 1 及び／又は 2 の有効濃度は、葉状体形成誘導を発揮できる範囲内であれば特に限定されないが、 $10^{-12} \sim 10^{-3} \mu\text{g/ml}$ とするのが好ましい。

培養時の温度は、海洋性大型緑藻類が生存できる範囲内であれば特に制限はないが、 $15 \sim 25^\circ\text{C}$ 程度が適当である。

5

図面の簡単な説明

図 1 は、新規化学物質 1 の質量スペクトルを示す。

図 2 は、新規化学物質 1 の ^1H -NMR スペクトルを示す。

図 3 は、新規化学物質 1 の ^{13}C -NMR スペクトルを示す。

10 図 4 は、新規化学物質 2 の ^1H -NMR スペクトルを示す。

図 5 は、実施例 1 のマキヒトエ培養実験におけるサンプルを添加しない場合の培養 5 日後のマキヒトエ培養細胞の写真である。

図 6 は、実施例 1 のマキヒトエ培養実験におけるサンプルを添加した場合の培養 5 日後のマキヒトエ培養細胞の写真である。

15 図 7 は、Me 1 の ^1H -NMR スペクトルを示す。

図 8 は、Me 1 の ^{13}C -NMR スペクトルを示す。

図 9 は、Me 1 B の ^1H -NMR スペクトルを示す。

図 10 は、Me 1 H 3 の ^1H -NMR スペクトルを示す。

図 11 は、Me 1 H 1 の ^1H -NMR スペクトルを示す。

20 図 12 は、Me 1 H 1 Me の ^1H -NMR スペクトルを示す。

図 13 は、実施例 5 の培養 10 日後の 7 段階希釈の写真である。

図 14 は、実施例 5 の培養 10 日後の 6 段階希釈の写真である。

図 15 は、実施例 7 におけるアナアオサでの実験結果を示す写真である。

図 16 は、実施例 7 におけるボウアオノリでの実験結果を示す写真である。

25 図 17 は、YM-1-69 株、YM-2-23 株及びこれらの類似菌株の *gyrB* DNA 系統樹を示す。

図 18 は、YM-1-69 株、YM-2-23 株及びこれら類似菌株の 16S rDNA 系統樹、並びにこれらの菌株の大型緑藻に対する形態形成誘導の比活性を示す。

図 19 は、新規化学物質 1 の部分構造を示す。

図 2 0 は、新規化学物質 1 の HMBC スペクトルを解析した結果を示す。

図 2 1 は、Me 1 の部分構造及び相対立体配置を示す。

図 2 2 は、Me 1 の HMBC スペクトルを解析した結果を示す。

図 2 3 は、Me 1 H 3 のスペクトルを解析した結果を示す。

5 図 2 4 は、Me 1 H 3 の HMBC スペクトルを解析した結果を示す。

図 2 5 は、Me 1 H 1 のスペクトルを解析した結果を示す。

図 2 6 は、Me 1 H 1 の HMBC スペクトルを解析した結果を示す。

図 2 7 は、Me 1 H 1 Me のスペクトルを解析した結果を示す。

図 2 8 は、Me 1 H 1 Me の HMBC スペクトルを解析した結果を示す。

10

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2 0 0 2 - 2 0 3 6 0 8 の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

15 以下に本発明を実施例により具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

〔参考例 1〕微生物の単離

本発明に使用する菌株は以下のように単離した。採集した新鮮藻体約 1 グラムに滅菌済みの海水 10 ミリリットルを添加し、1 分程度激しくボルテックスした。
20 上清を滅菌済み海水で更に 10 倍、100 倍希釈し、そのうち 100 マイクロリットルを 1/10 マリンアガープレートに分注し、滅菌済みのコンラージ棒でプレート全体に塗り広げた。室温で 2 ～ 3 日後に成長した黄～赤色のコロニーをそれぞれ別のマリンアガープレートに植菌し、単菌化されるまで植菌を続けた。24 穴あるいは 48 穴のマイクロプレートに 2 ないし 1 ミリリットルの ASP7 培地を分注し、それ
25 ぞれのウェルに単細胞化したマキヒトエを 20 細胞程度添加した。これに単菌化した各分離株のコロニーを滅菌済みの白金耳などを使って 2 穴ずつ直接接種した。このプレートを 19 ～ 22℃、明期 14 時間/暗期 10 時間で 5 日間培養し、マキヒトエの葉状体形成を倒立顕微鏡下で確認した。葉状体の形成がみられた菌株については前記と同じ方法で追試を行って確認をした。以上のようなスクリーニングの

結果、葉状体形成活性を示す菌株として、YM-1-69 株と YM-2-23 株が単離された。YM-1-69 株はサボテングサ (*Halimeda opuntia*) (緑藻ミル目) から単離された菌株であり、YM-2-23 株はヒトエグサ (*Monostroma nitidum*) (緑藻アオサ目) から単離された菌株である。

5 [参考例 2] 微生物の同定

参考例 1 で得られた微生物の 16S rRNA V3 領域及び *gyrB* 遺伝子の DNA 塩基配列を決定した。YM-1-69 株の 16S rRNA V3 領域及び *gyrB* 遺伝子の DNA 塩基配列をそれぞれ配列番号 1 及び配列番号 3 に示す。また、YM-2-23 株の 16S rRNA V3 領域及び *gyrB* 遺伝子の DNA 塩基配列をそれぞれ配列番号 2 及び配列番号 4 に示す。得られた配列についてデータベース検索 (DDBJ-fasta) を行った結果、各配列は表 1 に示す微生物の配列と高い相同性を示した。

表 1

配列	相同性 (%)	近縁配列を持つ生物	Accession Number
1	95.26	<i>Tenacibaculum amylolyticum</i>	AB032505
2	94.18	<i>Zobellia uliginosa</i>	M62799
3	84.91	<i>Tenacibaculum amylolyticum</i>	AB032586
4	78.18	<i>Zobellia uliginosa</i>	AB034224

15 また、YM-1-69 株及び YM-2-23 株の生理生化学的性質について調査した結果を表 2 に示す。

表 2

生理生化学的性質	YM-1-69	YM-2-23
グラム反応	—	—
カタラーゼ活性	+	+
オキシダーゼ活性	+	+
OF 試験	O	F
マグネシウムあるいはカルシウムの要求	+	+
硝酸塩の還元	+	+
インドール産生	—	—
ゼラチン加水分解	—	—
デンプン加水分解	+	+
DNA 加水分解	+	+
Tween80 加水分解	+	+
エスクリン加水分解	+	+
アルギニンジヒドロラーゼ活性	—	—
ウレアーゼ活性	—	—
β -ガラクトシダーゼ活性	—	+
クエン酸の利用	—	—
シモンズ培地	—	—
クリステンセン培地	—	—

＋：陽性、－：陰性

表 1 及び表 2 の結果から、YM-1-69 株はテナシバキュラム・スピーシーズ (*Tenacibaculum* sp.) と同定され、YM-2-23 株は *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodes complex* に属する菌株と同定された。

〔実施例 1〕 マキヒトエ培養実験

抗生物質等で無菌化処理したマキヒトエ (*Monostroma oxyspermum*) は ASP7 培地などの合成培地中では天然に見られるような葉状形態を失い、ほぼ単細胞状態となる。

- 10 48 孔浮遊培養用マイクロプレート (IWAKI 社製、以下 48-MTP と略す) の一列目に改変 ASP7 培地を 1ml、二列目以降に 0.9ml を添加し、一列目に試験対象となる活性物質分画フラクションを 11 μ l ずつ添加し、ピペッティングによりよく攪拌しながら次の列に 100 μ l を添加した。この操作を各フラクションに対して 8~18 回繰り返すことにより、10 倍ずつの希釈系列を 8~18 段階作成することができる。
- 15 最後の列に余る 100 μ l は破棄した。ここに、最終的に細胞濃度が 1ml あたり 10~20 細胞となるように希釈したマキヒトエ培養液を 48-MTP のすべての孔に 100 μ l ずつ添加して総量を 1ml とした。この 48-MTP を明期のみの条件で 22℃、3~5

日間培養し、倒立顕微鏡下で葉状体形成の判定を行った。葉状体形成が見られた最も低いサンプル濃度を最少有効濃度 (MEC) と定義し、MEC の最も低いサンプルに活性物質が集中していると考え、分離の指標とした。

5 サンプルを添加しない場合の培養 5 日後のマキヒトエ培養細胞の写真を図 5 に示す。また、サンプルを添加した場合の培養 5 日後のマキヒトエ培養細胞の写真を図 6 に示す。活性物質が存在した場合は図 6 のように葉状体の形成が見られた。

なお、ASP7 培地の組成は以下の通りである。

表 3

改変ASP7培地 (1 L 分、pH 7.8~8.0)

蒸留水	950 ml
NaCl	25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	9 g
KCl	700 mg
CaCl ₂	840 mg
Tris·HCl	1 g
NaNO ₃	50 mg
Na ₂ -glyceroPO ₄	20 mg
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	70 mg
Vitamin B12	1 μg
ニトリロ三酢酸	70 mg
Vitamin Mix S3 *1	10 ml
PII metals *2	30 ml
S2 metals *3	5 ml

10

表 4

*1 Vitamin Mix S3

蒸留水	100 ml
塩酸チアミン	5 mg
ニコチン酸	1 mg
パントテン酸カルシウム	1 mg
p-アミノ安息香酸	0.1 mg
ビオチン	0.01 mg
イノシトール	50 mg
チミン	30 mg
葉酸	0.02 mg

表 5

*2 PII metals

蒸留水	1000 ml
Na ₂ -EDTA	1 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	48 mg
H ₃ BO ₃	1.13 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	144 mg
ZnCl ₂	5.2 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	4 mg

表 6

*3 S2 metals

蒸留水	500 ml
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	63 mg
NaBr	640 mg
SrCl ₂ ·6H ₂ O	304 mg
RbCl	14 mg
LiCl	61 mg
KI	0.65 mg
V ₂ O ₅	0.18 mg

〔実施例 2〕新規化学物質 1 の分離・精製

種菌として YM-2-23 株 (FERM BP-8417) を用いた。本培養培地は、マリンプロス (ディフコ社製、37.4g/l、又は表示成分に従って各試薬を混合して調製) を用いた。該菌株を 100ml 三角フラスコ中で 50ml のマリンプロスをを用いて 30℃ で 24 時間振盪 (毎分 100 回転) 培養し、これを更に培地 450ml のバッフル付 1 リットル容三角フラスコに全量を植菌し、同様の条件で 24 時間培養した。本培養は、培地が 800ml 入ったバッフル付 1 リットル容三角フラスコ 16 本で振盪培養 (毎分 130 回転) 及び培地が 450ml 入った 1 リットル容三角フラスコ 10 本で振盪培養 (毎分 100 回転) で行い、培養温度 30℃、培養時間は 3 日間とした。このようにして得られた培養液約 18 リットルを遠心分離した。菌体は抽出するまで -20℃ に、培養濾液は 4℃ で保管した。前記本培養 4 回分 (約 72 リットル分) の菌体を 50% アセトニトリル水溶液 1200ml で二回抽出し、濃縮した。濃縮液を培養濾液約 72 リ

5 ットルとあわせ、スチレンジビニルベンゼンポリマーであるダイヤイオン HP-20
 (三菱化学株式会社) 2500ml に吸着させた。樹脂を 10%アセトニトリル水溶液
 6000ml で洗浄して脱塩し、50%アセトニトリル水溶液 6000ml で溶出して葉状体
 形成誘因画分を得た。活性画分を TOYOPEARL DEAE-650 (M) (東ソー株式会社) に
10 吸着させ、180mM NaCl-20%アセトニトリルで洗浄した後、450mM NaCl-20%アセ
 トニトリル水溶液で活性画分を溶出した。溶出画分を減圧濃縮してアセトニトリ
 ルを除いた後、ダイヤイオン HP-20 (三菱化学株式会社) 500ml に吸着させ、10%
 アセトニトリル水溶液 1000ml で洗浄して脱塩し、50%アセトニトリル水溶液
 1000ml で活性画分を得た。減圧濃縮した後、凍結乾燥を行い葉状体形成誘因画分
15 を得た。前記培養と粗画分の調製二回分(培養液約 140 リットル分)をあわせて、
 移動相として 100mM NaCl-20mM Na_2HPO_4 -20%アセトニトリル水溶液 (pH 9) を用
 いたゲル濾過クロマトグラフィー (アマシャムバイオサイエンス株式会社製
 Sephacryl S-100 HR 内径 25mm×長さ 1200mm) で精製し、葉状体誘因活性を示す
 画分を得た。この活性画分を濃縮、脱塩後、凍結乾燥し、移動相として 14~22%
20 アセトニトリル-5g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ /l 水溶液を用いた高速液体クロマトグラフィー (ア
 マシャムバイオサイエンス株式会社製 RESOURCE RPC 3 ML、内径 6.4mm×長さ 100mm
 ×2 本直列) で分離し、活性画分を凍結乾燥後、更に移動相として 5~25%アセト
 ニトリル-1% NH_3 水溶液を用いた高速液体クロマトグラフィー (アマシャムバイ
 オサイエンス株式会社製 RESOURCE RPC 3 ML、内径 6.4mm×長さ 100mm×2 本直列)
 にて精製したところ、前記の理化学的性質を有する本発明の新規化学物質 1 を約
 140 μg 得た。

[実施例 3] 新規化学物質 2 の分離・精製

25 実施例 2 に従って分離される新規化学物質 1 は最終精製における 5~25%アセ
 トニトリル-1% NH_3 水溶液という強アルカリ条件で新規化学物質 2 が変化したも
 のであることが明らかになっている。また、新規化学物質 1 は精製前の培養液上
 清に新規化学物質 2 とともに存在する。新規化学物質 2 は中性-弱酸性で極めて不
 安定であるがアルカリ条件で誘導される新規化学物質 1 は比較的安定である。実
 施例 2 における最終精製の段階で、移動相として 17%アセトニトリル-5g
 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ +5ml NH_3 /l 水溶液を用いた高速液体クロマトグラフィー (アマシャムバ

イオサイエンス株式会社製 RESOURCE RPC 3 ML、内径 6.4mm×長さ 100mm×2 本直列) により分離を行うと図 4 のような $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す化学物質 2 を得ることができる。

〔実施例 4〕 新規化学物質 1 のメチル化体及びその誘導体の調製と理化学的性質

5 新規化学物質 1 約 $140\text{ }\mu\text{g}$ をメタノール $40\text{ }\mu\text{l}$ に溶かし、ベンゼン $160\text{ }\mu\text{l}$ 、トリメチルシリルジアゾメタン (10%、*n*-ヘキサン溶液、東京化成工業株式会社製) $100\text{ }\mu\text{l}$ を添加してよく攪拌し室温で 2 時間反応させた。ジアゾメタンの黄色が消えるまで少量ずつ酢酸を添加し、エバポレーターで溶媒を留去した後、移動相として 50~100% アセトニトリル-水を用いた高速液体クロマトグラフィー (東ソ

10 ー株式会社製 TSKgel ODS-80Ts、内径 4.6mm×長さ 150mm) にて分離したところほぼ定量的 (収量約 $152\text{ }\mu\text{g}$ 、収率 99%) に新規化学物質 1 のトリメチル体 (以下 Me 1 と略す) を得た。また、このトリメチル体は NMR 測定溶媒である重メタノール中でメトキシ基 ($-\text{OCH}_3$) の一つが徐々に重メトキシ基 ($-\text{OCD}_3$) と置換し Me 1 B を与える。Me 1 約 $152\text{ }\mu\text{g}$ をメタノール $200\text{ }\mu\text{l}$ に溶かし氷冷下水素化ホウ素ナ

15 トリウム 1mg を添加し 1 時間還元させた。反応液を、移動相として 50~100% アセトニトリル-水を用いた高速液体クロマトグラフィー (東ソー株式会社製 TSKgel ODS-80Ts、内径 4.6mm×長さ 150mm) にて分離したところ高収量で (収量約 $140\text{ }\mu\text{g}$ 、収率 98%) Me 1 の還元体 (以下 Me 1 H 3 と略す) を得た。ここで

20 得た Me 1 H 3 の全量を乾燥ジエチルエーテル $400\text{ }\mu\text{l}$ に溶かし、室温で 20mg/ml 水素化ホウ素ナトリウムエタノール溶液 $100\text{ }\mu\text{l}$ を添加し室温で 150 分間反応させた。飽和塩化ナトリウム水溶液 $100\text{ }\mu\text{l}$ を添加して 10 分間攪拌した後、エバポレーターで溶媒を留去した。移動相として 50~100% アセトニトリル-水を用いた高速液体クロマトグラフィー (東ソー株式会社製 TSKgel ODS-80Ts、内径 4.6mm×

25 長さ 150mm) にて分離したところほぼ定量的 (収量約 $123\text{ }\mu\text{g}$ 、収率 99%) に Me 1 の高還元体 (以下 Me 1 H 1 と略す) を得た。更に、ここで得た Me 1 H 1 の全量を乾燥ジメチルスルホキシド $400\text{ }\mu\text{l}$ に溶かし、細かく砕いた水酸化ナトリウム 1mg を添加した後、ヨウ化メチル $40\text{ }\mu\text{l}$ を加えて室温で 30 分反応させた。氷冷下、蒸留水 $500\text{ }\mu\text{l}$ を加えて反応を止めた後、移動相として 50~100% アセトニトリル-水を用いた高速液体クロマトグラフィー (東ソー株式会社製 TSKgel

ODS-80Ts、内径 4.6mm×長さ 150mm) にて反応液をそのまま分離したところほぼ定量的 (収量約 135 μ g、収率 99%) に Me 1 H 1 のメチル化体 (以下 Me 1 H 1 M e と略す) を得た。

ここで得た化合物は、以下に示した理化学的性質を示した。

5 [Me 1 の理化学的性質]

1. 物質の色 : 無色

2. 分子量 : 499

3. 分子式 : $C_{27}H_{37}N_3O_4S$

質量分析 : FABMS : m/z 500 $[M+H]^+$

10 高分解能質量分析 : 実測値 500.2569 $[M+H]^+$

計算値 500.2583 ($C_{27}H_{38}N_3O_4S$)

4. 核磁気共鳴シグナル :

1) 1H -NMR (重メタノール、500 MHz) : (図 7)

15 δ ppm 0.916 (3H, s), 0.941 (3H, s), 0.973 (3H, s), 1.086 (1H, ddd, $J = 3.5$, 12.5, 13.0 Hz), 1.136 (1H, dd, $J = 2.0$, 12.0 Hz), 1.271 (1H, ddd, $J = 4.0$, 13.0, 14.0 Hz), 1.380 (3H, s), 1.47 (2H, m), 1.50 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.69 (2H, m), 1.73 (1H, m), 1.84 (1H, m), 2.130 (1H, ddd, $J = 3.5$, 7.0, 12.5 Hz), 2.34 (2H, m), 3.488 (3H, s), 3.914 (3H, s), 4.034 (3H, s), 7.911 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.258 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)

20 2) ^{13}C -NMR (重メタノール、125 MHz) : (図 8)

δ ppm 15.413 (q), 19.559 (t), 20.797 (t), 20.961 (q), 21.981 (q), 28.416 (t), 33.855 (q), 34.164 (s), 37.928 (s), 40.356 (t), 41.722 (t), 42.996 (t), 52.266 (q), 53.255 (q), 52.255 (q), 53.328 (d), 57.432 (d), 79.291 (s), 120.0 (s), 127.392 (d), 140.407 (d), 141.6 (s), 146.659 (s), 149.8 (s), 164.761 (s), 25 166.027 (s), 167.402 (s)

5. 溶解性 : 水及び DMSO に難溶、50~100%メタノール水溶液、50~100%アセトニトリル水溶液などの含水溶媒に可溶、ヘキサン、クロロホルム等の低極性有機溶媒に難溶。

[Me 1 B の理化学的性質]

1. 物質の色：無色

2. 分子量：502

3. 分子式： $C_{27}H_{34}D_3N_3O_4S$

質量分析：FABMS： m/z 503 $[M+H]^+$

5 高分解能質量分析：実測値 503.2777 $[M+H]^+$

計算値 503.2772 ($C_{27}H_{35}D_3N_3O_4S$)

4. 核磁気共鳴シグナル：

1H -NMR (重メタノール、500 MHz)：(図 9)

(10 δ ppm 0.916 (3H, s), 0.941 (3H, s), 0.973 (3H, s), 1.086 (1H, ddd, $J = 3.5, 12.5, 13.0$ Hz), 1.136 (1H, dd, $J = 2.0, 12.0$ Hz), 1.271 (1H, ddd, $J = 4.0, 13.0, 14.0$ Hz), 1.380 (3H, s), 1.47 (2H, m), 1.50 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.69 (2H, m), 1.73 (1H, m), 1.84 (1H, m), 2.130 (1H, ddd, $J = 3.5, 7.0, 12.5$ Hz), 2.34 (2H, m), 3.488 (3H, s), 3.914 (3H, s), 7.911 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.258 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)

15 5. 溶解性：水及び DMSO に難溶、50～100%メタノール水溶液、50～100%アセトニトリル水溶液などの含水溶媒に可溶、ヘキサン、クロロホルム等の低極性有機溶媒に難溶。

[Me 1 H 3 の理化学的性質]

1. 物質の色：無色

20 2. 分子量：471

3. 分子式： $C_{26}H_{37}N_3O_3S$

質量分析：FABMS： m/z 472 $[M+H]^+$

高分解能質量分析：実測値 472.2630 $[M+H]^+$

計算値 472.2634 ($C_{26}H_{38}N_3O_3S$)

25 4. 核磁気共鳴シグナル：

1H -NMR (DMSO- d_6 、500 MHz)：(図 10)

δ ppm 0.802 (3H, s), 0.810 (3H, s), 0.885 (3H, s), 0.951 (1H, m), 1.018 (1H, m), 1.150 (1H, m), 1.254 (3H, s), 1.35 (1H, m), 1.36 (1H, m), 1.37 (1H, m), 1.50 (1H, m), 1.54 (1H, m), 1.57 (1H, m), 1.58 (1H, m), 1.688 (1H, m), 1.984

(1H, m), 2.174 (2H, br d, J = 8.5 Hz), 3.399 (3H, s), 3.741 (3H, s), 4.570 (2H, br d, J = 5.5 Hz), 5.495 (1H, br t, J = 5.5 Hz), 7.587 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.722 (1H, d, J = 8.0 Hz)

2) ^{13}C -NMR (重メタノール、HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) 及び HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) スペクトルをもとにケミカルシフトを算定):

δ ppm 14.2 (q), 17.7 (t), 19.0 (t), 20.0 (q), 21.1 (q), 26.7 (t), 33.0 (q), 33.3 (s), 36.1 (s), 38.3 (t), 40.1 (t), 41.1 (t), 51.2 (q), 51.2 (d), 52.0 (q), 55.2 (d), 63.7 (t), 76.8 (s), 119.2 (s), 121.8 (d), 134.1 (s), 138.3 (d), 146.2 (s), 159.8 (s), 162.8 (s), 166.2 (s)

5. 溶解性: 水及び 100%メタノールに難溶、50%メタノール水溶液、50%アセトニトリル水溶液などの含水溶媒に可溶、DMSO に可溶、ヘキサン、クロロホルム等の低極性有機溶媒に難溶。

[Me 1 H 1 の理化学的性質]

1. 物質の色: 無色

2. 分子量: 415

3. 分子式: $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{OS}$

質量分析: FABMS: m/z 416 $[\text{M}+\text{H}]^+$

高分解能質量分析: 実測値 416.2747 $[\text{M}+\text{H}]^+$

20 計算値 416.2735 ($\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{OS}$)

4. 核磁気共鳴シグナル:

1) ^1H -NMR (重クロロホルム、500 MHz): (図 1 1)

δ ppm 0.842 (6H, s), 0.918 (3H, s), 0.97 (1H, m), 1.04 (1H, m), 1.18 (1H, m), 1.327 (3H, s), 1.36 (1H, m), 1.42 (1H, m), 1.45 (1H, m), 1.55 (1H, m), 1.58 (1H, m), 1.64 (1H, m), 1.667 (1H, dd, J = 5.5, 12 Hz), 1.78 (1H, m), 2.02 (2H, m), 2.05 (1H, m), 3.650 (2H, d, J = 12 Hz), 4.647 (2H, d, J = 14 Hz), 4.801 (2H, br s), 7.226 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.474 (1H, d, J = 8.0 Hz)

2) ^{13}C -NMR (重クロロホルム、HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) 及び HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) スペクトルをもとにケミ

カルシフトを算定)

δ ppm 15.1 (q), 18.4 (t), 19.8 (t), 20.9 (q), 21.5 (q), 25.1 (t), 33.2 (s),
33.3 (q), 36.8 (s), 39.2 (t), 40.7 (t), 41.7 (t), 52.5 (d), 56.0 (d), 60.61
(t), 62.33 (t), 64.73 (t), 77.0 (s), 106.0 (s), 119.8 (d), 133.2 (s), 139.7
5 (d), 148.0 (s), 156.2 (s)

5.溶解性：水に難溶、10～100%メタノール水溶液、10～100%アセトニトリル水
溶液などの含水溶媒に可溶、ヘキサン、クロロホルム等の低極性有機溶媒に可溶。

[Me 1 H 1 Me の理化学的性質]

1. 物質の色：無色

10 2. 分子量：457

3. 分子式： $C_{27}H_{43}N_3OS$

質量分析：FABMS： m/z 458 $[M+H]^+$

高分解能質量分析：実測値 458.3201 $[M+H]^+$

計算値 458.3205 ($C_{27}H_{43}N_3OS$)

15 4. 核磁気共鳴シグナル：

1) 1H -NMR (重クロロホルム、500 MHz)：(図 1 2)

δ ppm 0.847 (6H, s), 0.921 (3H, s), 0.96 (1H, m), 1.05 (1H, m), 1.18 (1H,
m), 1.331 (3H, s), 1.36 (1H, m), 1.41 (1H, m), 1.43 (1H, m), 1.57 (1H, m),
1.59 (1H, m), 1.67 (1H, m), 1.68 (1H, m), 1.77 (1H, br d, $J = 13$ Hz), 2.00
20 (1H, m), 2.09 (1H, m), 2.16 (1H, m), 3.19 (3H, br s), 3.45 (3H, br s), 3.509
(3H, s), 3.564 (2H, d, $J = 12$ Hz), 4.419 (2H, dd, $J = 8.5, 10.5$ Hz), 4.644
(2H, br s), 7.356 (1H, d, $J = 7.0$ Hz), 7.488 (1H, d, $J = 7.0$ Hz)

2) ^{13}C -NMR (重クロロホルム、HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
及び HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) スペクトルをもとにケミ
25 カルシフトを算定)

δ ppm 15.0 (q), 18.7 (t), 20.0 (t), 20.6 (q), 21.7 (q), 26.2 (t), 33.2 (s),
33.5 (q), 36.9 (s), 39.4 (t), 41.0 (t), 42.0 (t), 52.8 (d), 56.2 (d), 58.4
(q), 59.0 (q), 59.1 (q), 70.2 (s), 74.0 (s), 75.6 (s), 76.9 (s), 109.9 (s),
120.5 (d), 135.1 (s), 139.2 (d), 145.7 (s), 155.1 (s)

5. 溶解性：水に難溶、30～100%メタノール水溶液、30～100%アセトニトリル水溶液などの含水溶媒に可溶、ヘキサン、クロロホルム等の低極性有機溶媒に可溶。

[実施例5] 新規化学物質1の最少有効濃度(MEC)の検討

実施例1の場合と同様に48-MTPに単離精製した新規化学物質1を終濃度1 μ g/mlからはじめ、16段階希釈を行った。このとき、マキヒトエの細胞は培地1mlあたり約20細胞とした。希釈の際は一段階希釈するごとにピペットチップを交換した。このシリーズを3列用意し、実施例1と同様に3日間培養した。その結果、12段階希釈の列までマキヒトエの葉状体形成が見られた。このことから新規化学物質1のMECは、

10 $1\mu\text{g/ml} \times 10^{-12} = 1\text{ag/ml}$ (atto-gram per milliliter)

となる。長期の培養に伴い、新規化学物質1は増殖したマキヒトエに消費され、葉状体が崩壊し始める。培養10日後の7段階希釈(新規化学物質1終濃度 1×10^{-7} $\mu\text{g/ml}$)の写真を図13に示す。葉状体の原型がやや残っているが葉状体崩壊が観察される。培養10日後の6段階希釈(新規化学物質1終濃度 1×10^{-6} $\mu\text{g/ml}$)の写真を図14に示す。葉状体が崩壊せずに維持されており、培養10日後のMECは、

15 $1 \times 10^{-6} \mu\text{g/ml} = 1\text{pg/ml}$ (pico-gram per milliliter)

となる。マキヒトエの細胞は実施例1の条件では一日に約2回細胞分裂を行うことから初期細胞数が20の場合、3日後には計算上、

20 $20 \times (2 \times 2)^3 = 1,280$ 細胞

であるが、10日間の培養では計算上、

$20 \times (2 \times 2)^{10} = 20,971,520$ 細胞

となり、3日後と比べると10日後には細胞数が10,000倍以上に増殖しており、MECが細胞数と培養日数によって大きく変化することが説明できる。つまり、新規化学物質1は培養日数と細胞の増殖に応じて適宜添加する必要がある。

25

[実施例6] 新規化学物質1及び誘導体の活性

実施例5と同様に新規化学物質1及びその誘導体についての最少有効濃度を測定したところ以下のような結果となった。

表 7

最少有効濃度

新規化学物質 1	10^{-12} $\mu\text{g/ml}$
Me 1	10^{-4} $\mu\text{g/ml}$
Me 1 H 3	10^{-2} $\mu\text{g/ml}$
Me 1 H 1	活性なし

新規化学物質 1 をメチル化すると活性が $1/10^8$ に減少した。このことから活性に
5 は実施例 4 に示したようにトリメチルシリルジアゾメタン等のメチル化剤でメチル化される官能基が重要であると考えられる。

〔実施例 7〕 アナアオサ、ボウアオノリの培養実験

静岡県清水市三保で採集したアナアオサ (*Ulva pertusa*)、ボウアオノリ (*Enteromorpha intestinalis*) から得られた遊走細胞を抗生物質混液添加 ASP7 培地
10 で走光性を利用して洗浄後、滅菌したカバーガラスを敷き詰めた角形シャーレに添加して 5 日間の無菌化処理を行った。カバーガラスに遊走細胞が着底し発生が始まったところで各カバーガラスを 6-MTP の各孔に入れ、抗生物質の入っていない ASP7 培地 10ml を添加した。試験区には新規化学物質 1 を 1ng/ml となるように添加し、対象区には何も添加せずに実施例 1 と同じ条件で 7 日間培養した。10
15 日後、試験区、対象区のカバーガラスを更に同じ条件の培地が添加してある培養試験管に植え継いで更に 7 日間培養した。アナアオサでの実験結果を図 15 に、ボウアオノリの実験結果を図 16 に示す。試験区、対象区を比較すると明らかのように、対象区の場合は仮根だけが異常に発達し、正常な葉状体の形成が見られないが、新規化学物質 1 を添加した場合は、着底後の正常な発生と葉状体の形成
20 が見られた。

また、抗生物質混液添加 ASP7 培地は、ASP7 培地に以下の組成を持つ抗生物質混液を 2% 添加したものである。

表 8

抗生物質混液

蒸留水	1000 ml
ペニシリン	100 mg
ストレプトマイシン	200 mg
カナマイシン	100 mg

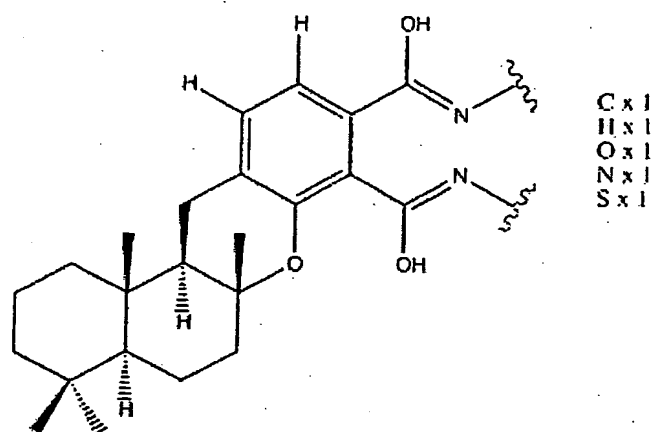
5 [実施例 8] 大型緑藻に対する形態形成誘導の比活性

実施例 5 と同様にして、YM-1-69 株及び YM-2-23 株、並びに図 1 7 に示した類似菌株についての最少有効濃度を測定したところ図 1 8 に示す結果が得られた。ここで、横軸は類似菌株の培養上清 1 μ l で活性化されるマキヒトエ培養液の ml 数を表す。例えば、図 1 8 において YM-2-23 株は培養上清液 1 μ l でマキヒトエ培養液約 10 8000 ml 活性化させることが可能である。

[実施例 9] 新規化学物質 1 及びその誘導体の部分構造の決定

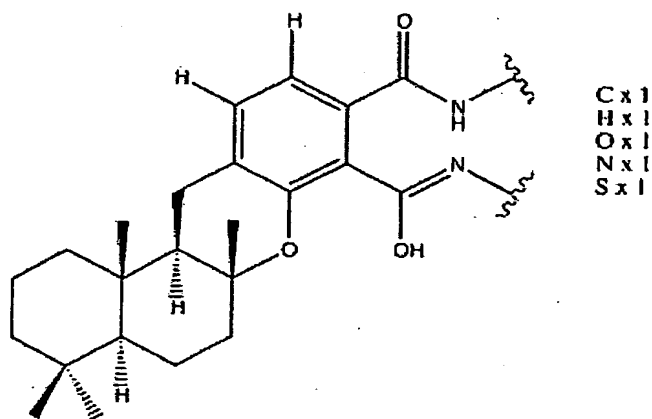
新規化学物質 1 の各種 NMR スペクトル及びマススペクトルから図 1 9 に示した部分構造が導かれた。これらの部分構造を、HMBC スペクトルを解析することにより図 2 0 に示した driman タイプのテルペノイド構造と 4 置換ベンゼン環につなげることができた。図 2 1 に示したように、新規化学物質 1 のトリメチル化体 Me 15 1 の NMR スペクトルからは更に 4 置換ベンゼン環の一置換基の部分構造と NOESY スペクトルを解析することにより相対立体配置を決定した。また、図 2 2 に示したように HMBC スペクトルからこれまでの推定構造を確認した。図 2 3 及び図 2 4 に示したように Me 1 H 3 においては、driman 部分とベンゼン環の間で NOESY 及び 20 HMBC スペクトルの相関ピークが観察され、これら二つの構造を炭素番号 11-16、及び 8-0-21 でつなぎ、部分構造を推定した。新規化学物質 1 の還元体 Me 1 H 1 においては 24 位のメチレン基とベンゼン環上の 21 位の間に相関ピークが観測され、図 2 5 及び図 2 6 に示したように 4 置換ベンゼン環の最後の置換基が決定した。Me 1 H 1 のメチル化体 Me 1 H 1 Me の各種 NMR スペクトルから図 2 7 及び図 25 2 8 に示したようにベンゼン環、N-メチル基、24 位のメチレン基の相関が観測され、これまでの推定部分構造を確認した。

実施例 4 に示したように、Me 1 H 1 Me は新規化学物質 1 をメチル化、還元
 反応、再メチル化した化合物であるので、新規化学物質 1 は式 1 :

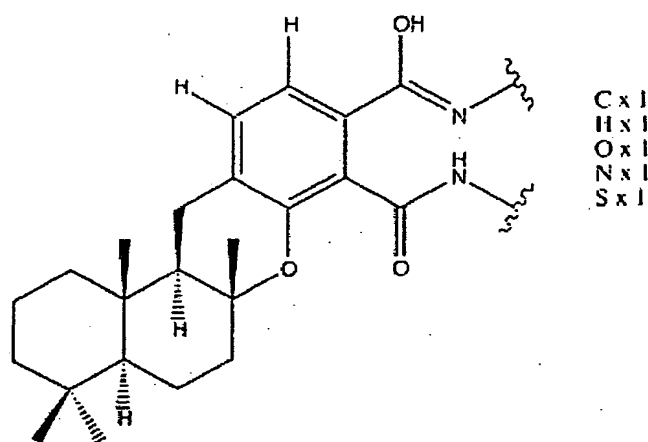


に示したような構造となる。また、実施例 3 に示したように、新規化学物質 1 は
 5 新規化学物質 2 のアルカリ処理による誘導体であるため、新規化学物質 2 は、前
 記式 1 の化合物のケトン体である式 2、式 3 あるいは式 4 のいずれかで示される
 化合物、あるいはこれらの混合物である。

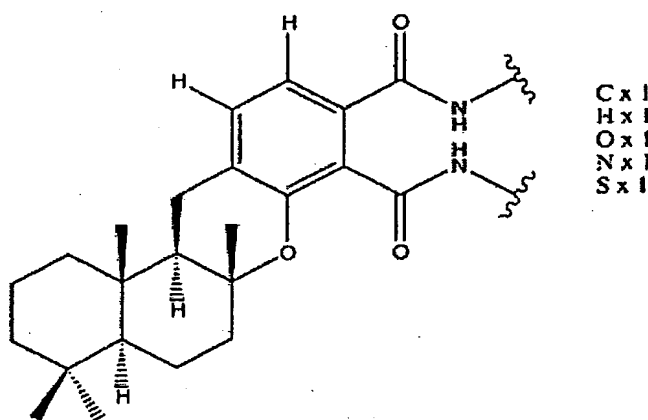
式 2 :



式 3 :

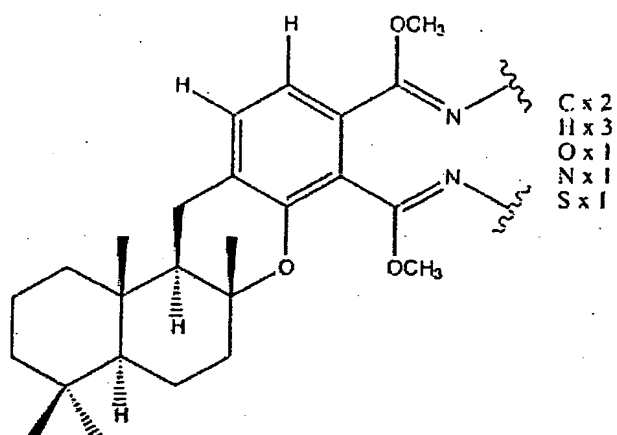


式 4 :

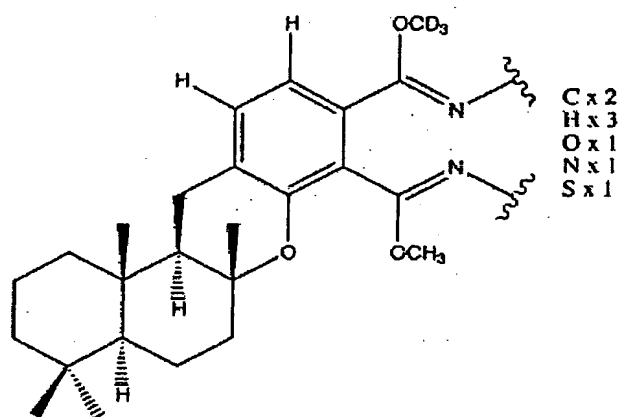


- 5 更に、Me 1 の構造を式 5 に、実施例 4 に示した Me 1 の重メトキシ置換基体 Me 1 B の構造を式 6 に、Me 1 の部分還元体 Me 1 H 3 の構造を式 7 に、Me 1 の還元体 Me 1 H 1 の構造を式 8 に、Me 1 H 1 の再メチル化体 Me 1 H 1 M e の構造を式 9 に示した。

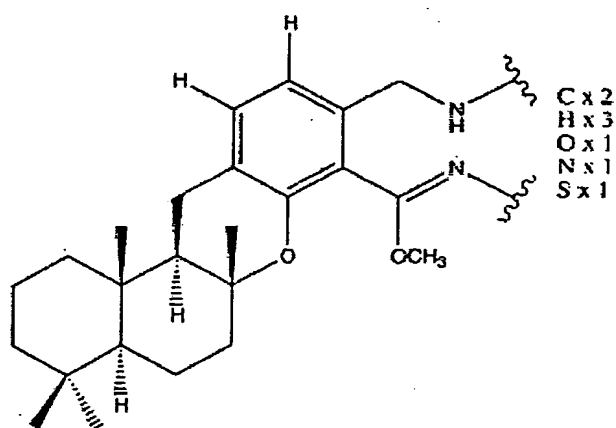
式 5 :



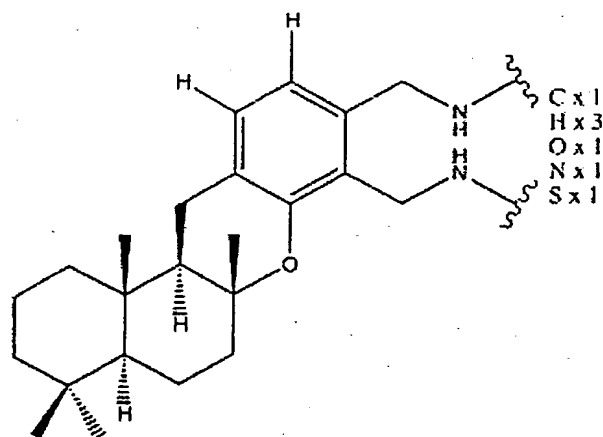
式 6 :



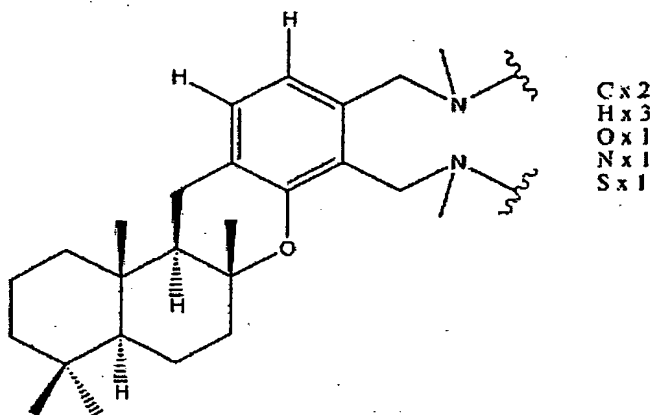
式 7 :



式 8 :



式 9 :



- 5 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

- 10 本発明は、新規化学物質を使ったアオサ、ヒトエグサなどの海洋性大型緑藻類の新規な培養・養殖技術を提供する。この方法によれば、実験室内での無菌的な培養や種苗の安全な維持管理、更に、養殖現場等での海洋性大型緑藻類の安定な成長と生産を行うことが可能である。

請 求 の 範 囲

1. 下記の理化学的性質：

(i) 物質の色：無色

5 (ii) 分子量：457

(iii) 分子式： $C_{24}H_{31}N_3O_4S$

質量分析：FABMS： m/z 456 $[M-H]^-$ (図 1)

高分解能質量分析：実測値 456.1960 $[M-H]^-$

計算値 456.1930 ($C_{24}H_{30}N_3O_4S$)

10 (iv) 核磁気共鳴シグナル：

1) 1H -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、750 MHz)：(図 2)

δ ppm 0.818 (3H, s), 0.837 (3H, s), 0.882 (3H, s), 0.960 (1H, m), 1.058 (1H, m), 1.167 (1H, m), 1.326 (3H, s), 1.37 (1H, m), 1.38 (1H, m), 1.40 (1H, m), 1.58 (1H, m), 1.61 (2H, m), 1.52 (1H, br d, $J = 13$ Hz), 1.76 (1H, br d, $J = 14$ Hz), 2.024 (1H, m), 2.181 (1H, dd, $J = 4, 14$ Hz), 2.291 (1H, dd, $J = 14, 16.5$ Hz), 7.698 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 7.845 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)

2) ^{13}C -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、125 MHz)：(図 3)

δ ppm 15.236 (q), 19.037 (t), 20.287 (t), 20.955 (q), 21.835 (q), 25.987 (t), 33.381 (s), 33.636 (q), 37.308 (s), 39.590 (t), 41.199 (t), 42.346 (t), 52.769 (d), 56.381 (d), 79.096 (s), 114.965 (s), 124.399 (d), 139.004 (s), 141.232 (d), 150.282 (s), 152.656 (s), 172.081 (s), 173.538 (s), 174.661 (s)

を有する新規化学物質 1。

2. 下記の理化学的性質：

(i) 物質の色：無色

25 (ii) 核磁気共鳴シグナル：

1H -NMR (D_2O -20 mM Na_2HPO_4 (pH 9)、500 MHz)：(図 4)

δ ppm 0.815 (3H, s), 0.834 (3H, s), 0.877 (3H, s), 0.949 (1H, m), 1.048 (1H, m), 1.163 (1H, m), 1.297 (3H, s), 1.35 - 1.40 (3H, m), 1.52 - 1.63 (4H, m), 1.753 (1H, br d, $J = 14$ Hz), 2.012 (1H, m), 2.158 (1H, m), 2.299 (1H, m),

7.646 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.769 (1H, d, J = 8.0 Hz)

を有する新規化学物質 2。

3. 請求の範囲第 1 項記載の新規化学物質 1 を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に新規化学物質 1 を生成蓄積させ、該生成蓄積した新規化

5 学物質 1 を採取することを特徴とする新規化学物質 1 の製造法。

4. 請求の範囲第 2 項記載の新規化学物質 2 を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に新規化学物質 2 を生成蓄積させ、該生成蓄積した新規化学物質 2 を採取することを特徴とする新規化学物質 2 の製造法。

5. 微生物が YM-2-23 株 (FERM BP-8417)、テナシバキュラム・スピーシーズ
10 (Tenacibaculum sp.) YM-1-69 (FERM BP-8418) 又はそれらの類似菌株である請求の範囲第 3 項記載の製造法。

6. 微生物が YM-2-23 株 (FERM BP-8417)、テナシバキュラム・スピーシーズ (Tenacibaculum sp.) YM-1-69 (FERM BP-8418) 又はそれらの類似菌株である請求の範囲第 4 項記載の製造法。

15 7. 請求の範囲第 1 項記載の新規化学物質 1 を有効成分として含有する藻類培養用培地。

8. 請求の範囲第 2 項記載の新規化学物質 2 を有効成分として含有する藻類培養用培地。

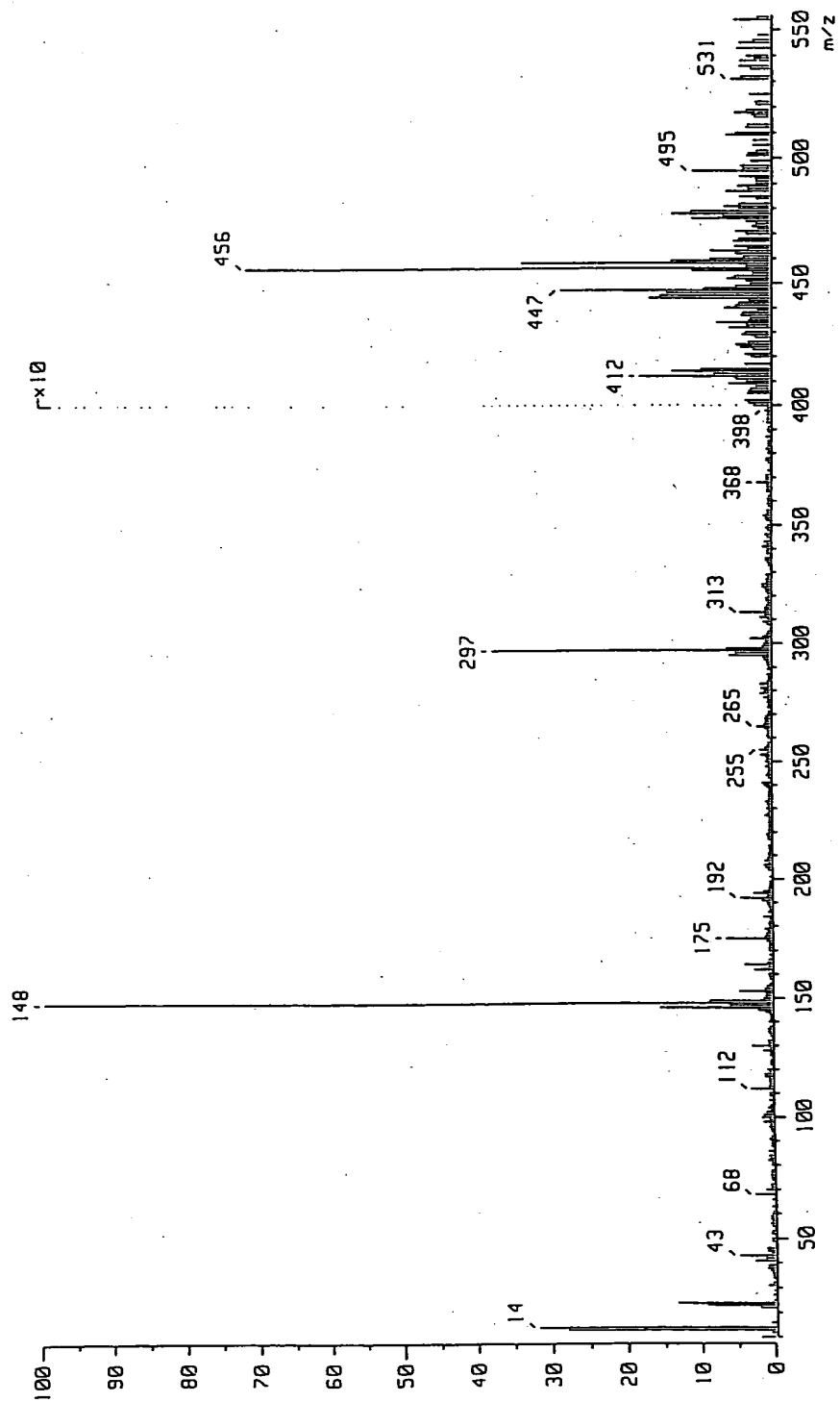
9. 請求の範囲第 1 項記載の新規化学物質 1 をトリメチルシリルジアゾメタンで
20 処理することにより得られる該新規化学物質 1 のモノメチル化体、ジメチル化体又はトリメチル化体。

10. 請求の範囲第 9 項記載のトリメチル化体を水素化ホウ素ナトリウムで処理することにより得られる化合物又はその誘導体。

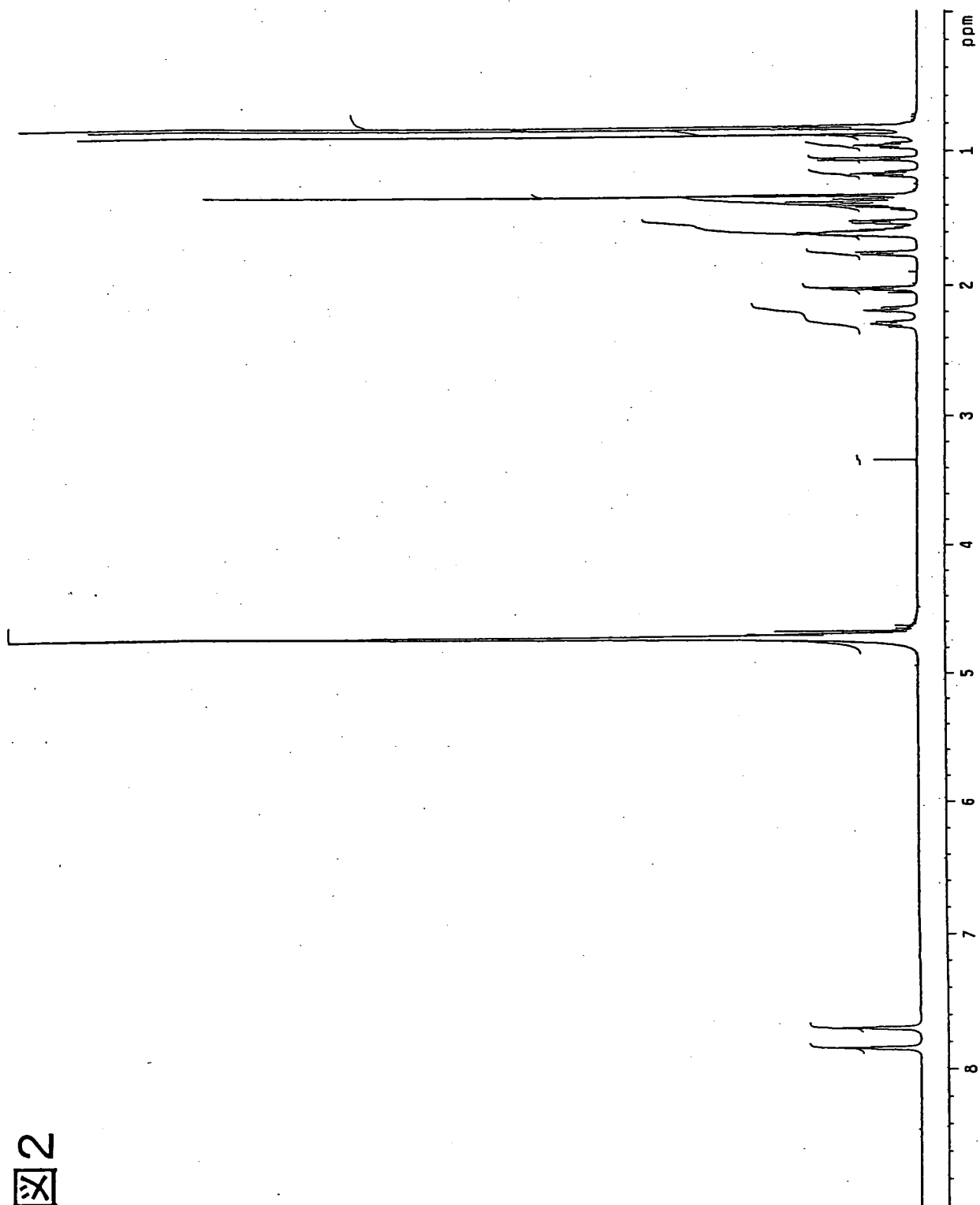
要 約 書

本発明は、海洋性大型緑藻類の形態形成、成長促進を誘引する新規化学物質、微生物を用いて前記新規化学物質を製造する方法、及び前記新規化学物質を含有する藻類培養用培地に関する。

図 1



2



3

3/31

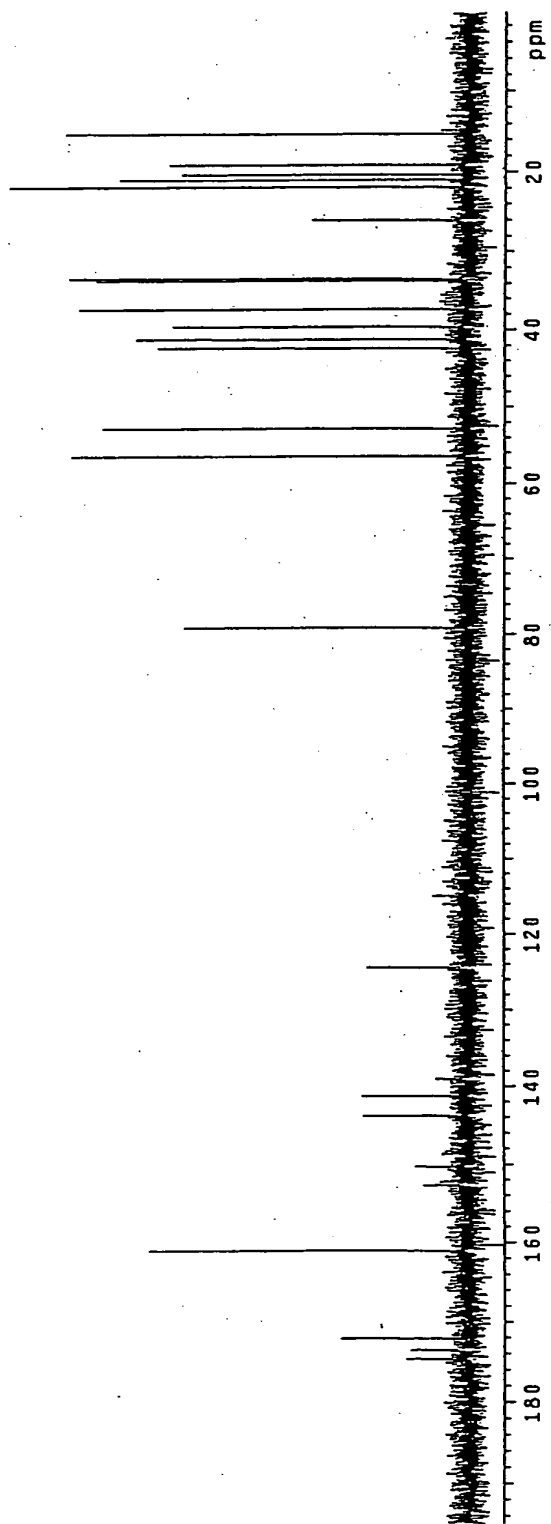
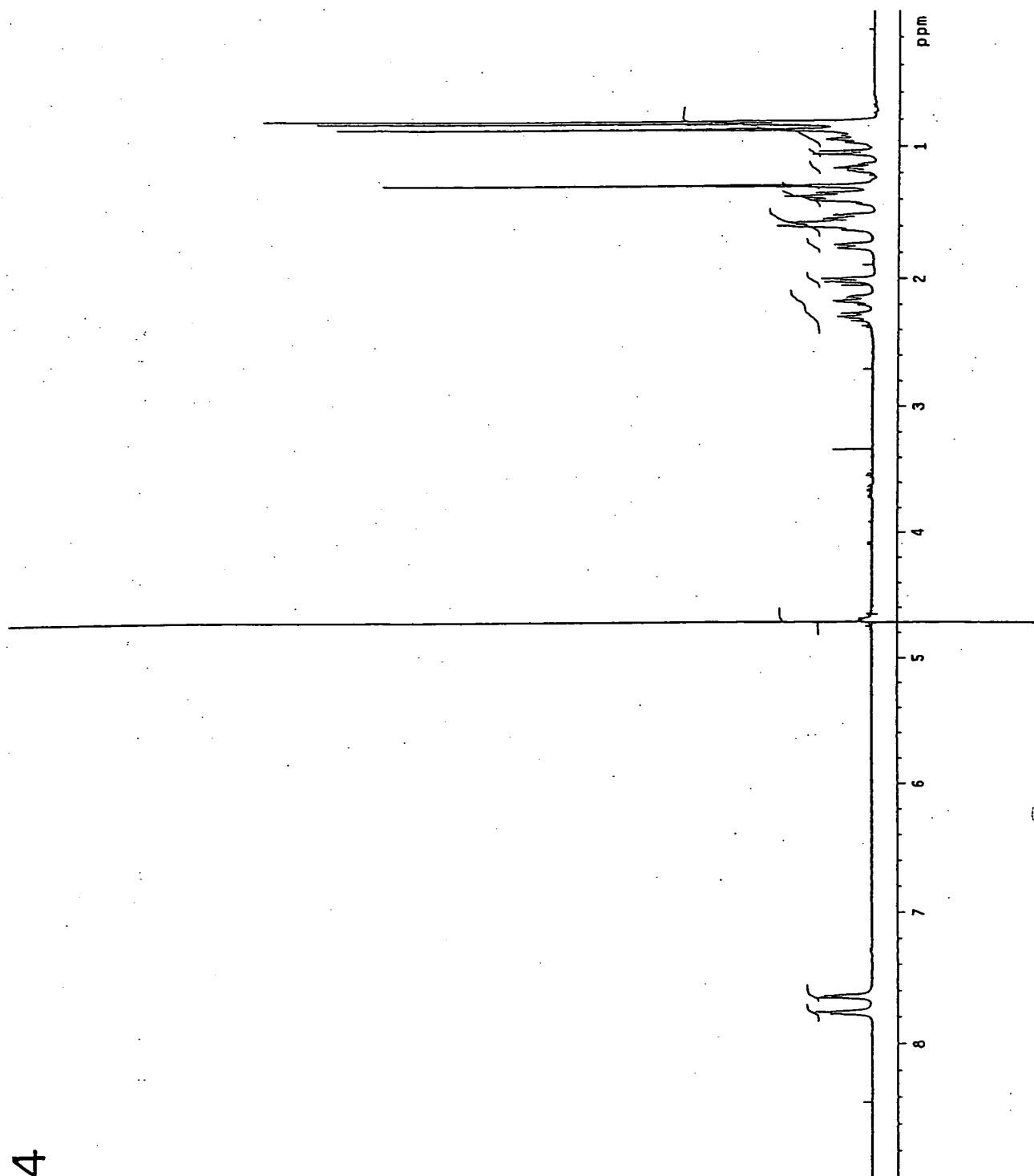
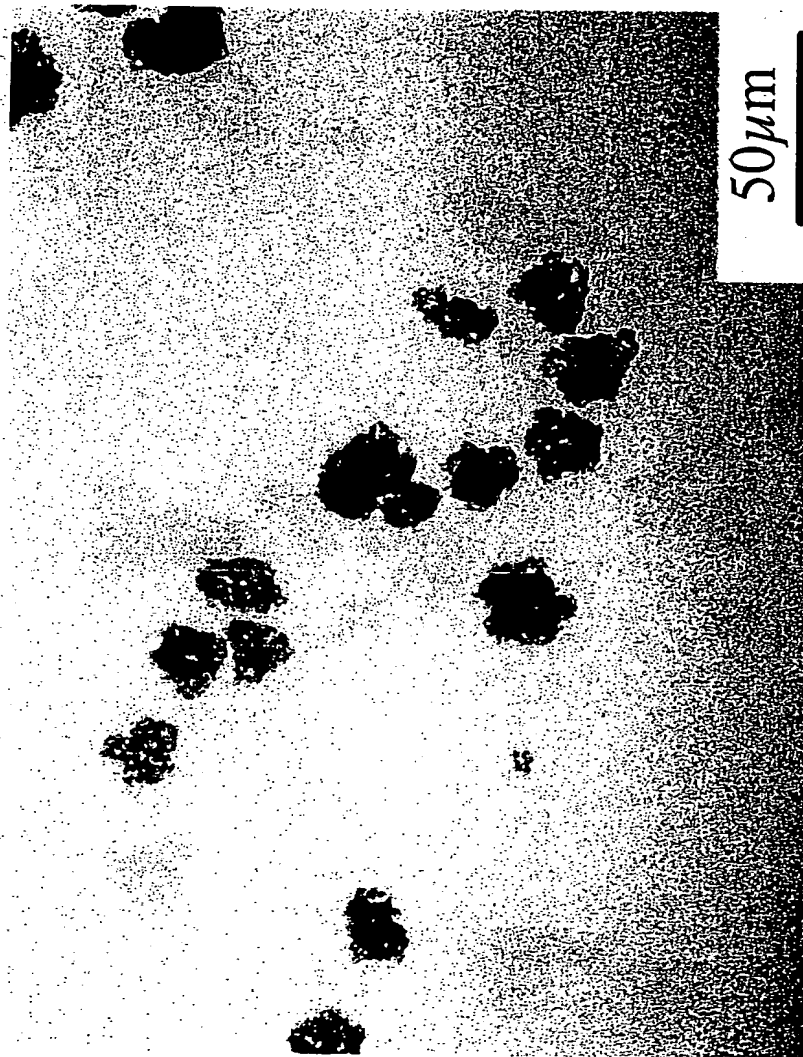


图4



5



6
X

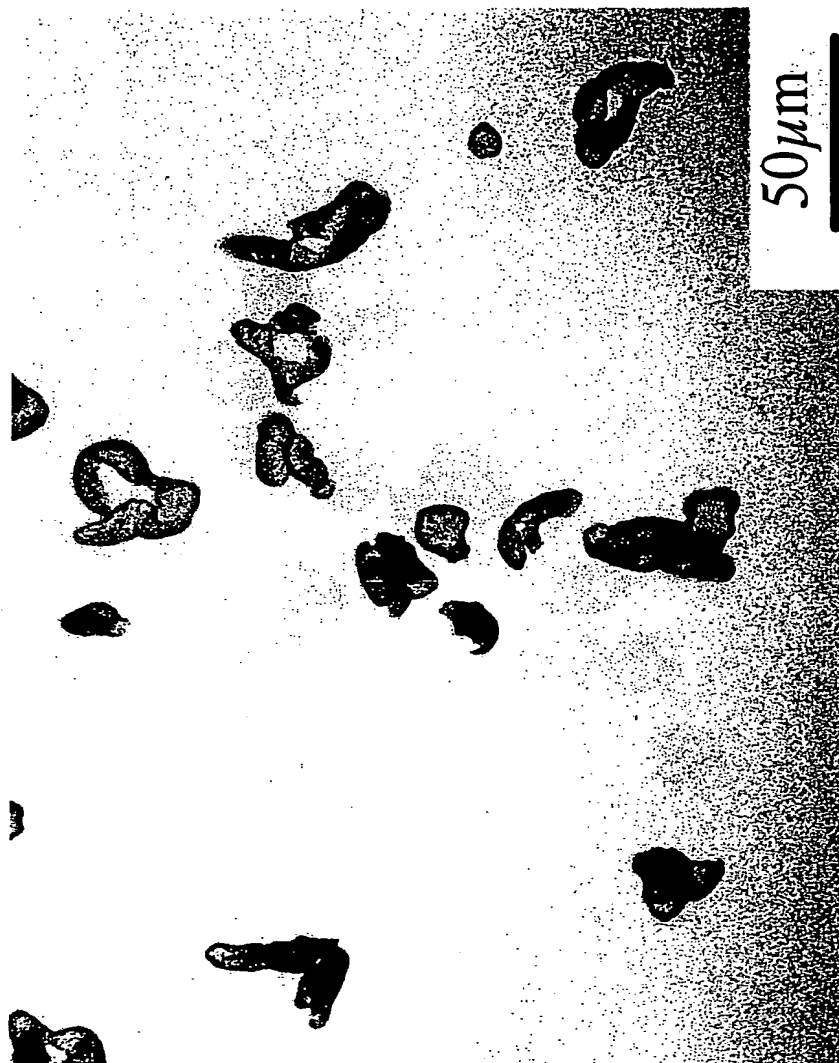
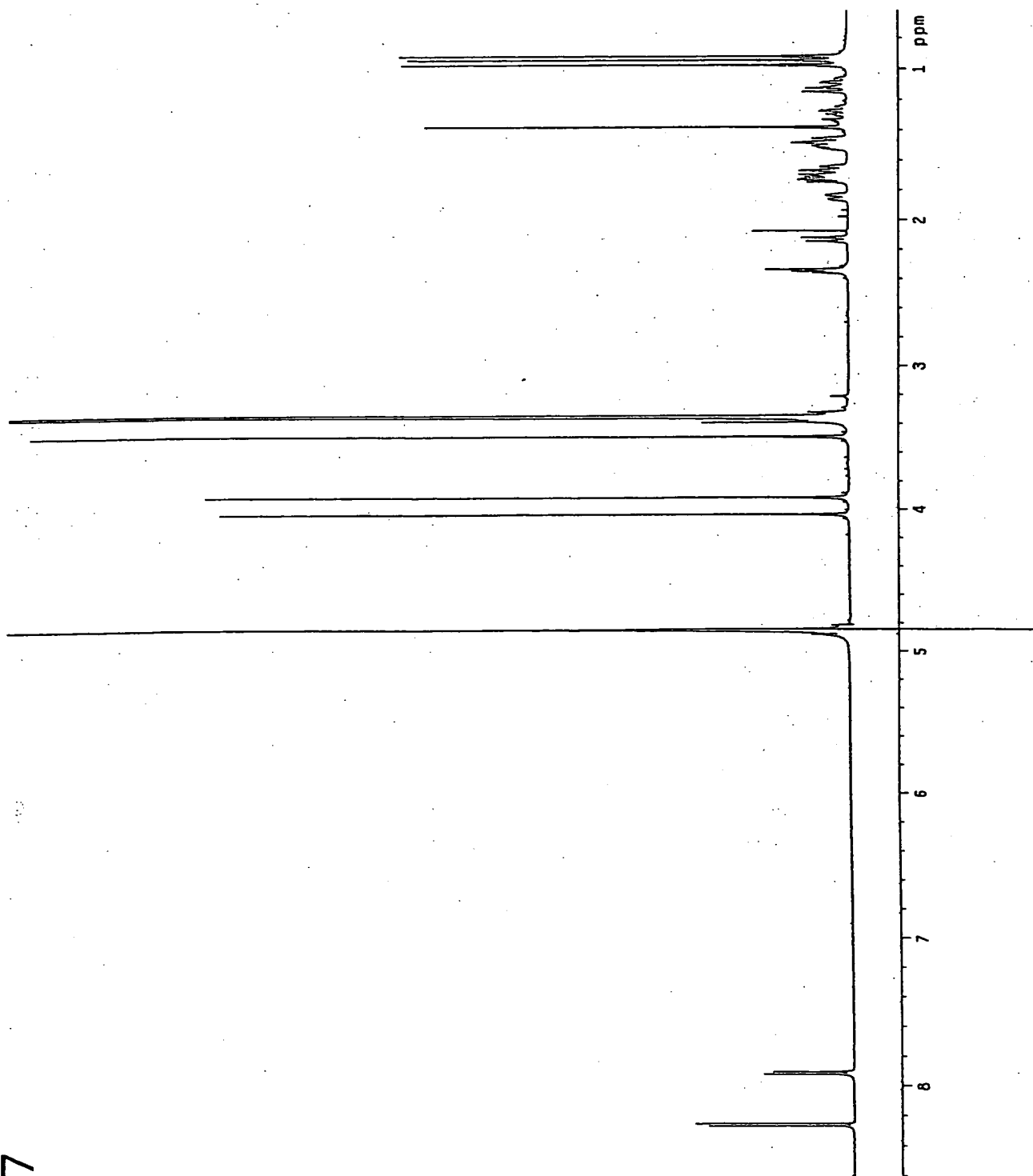
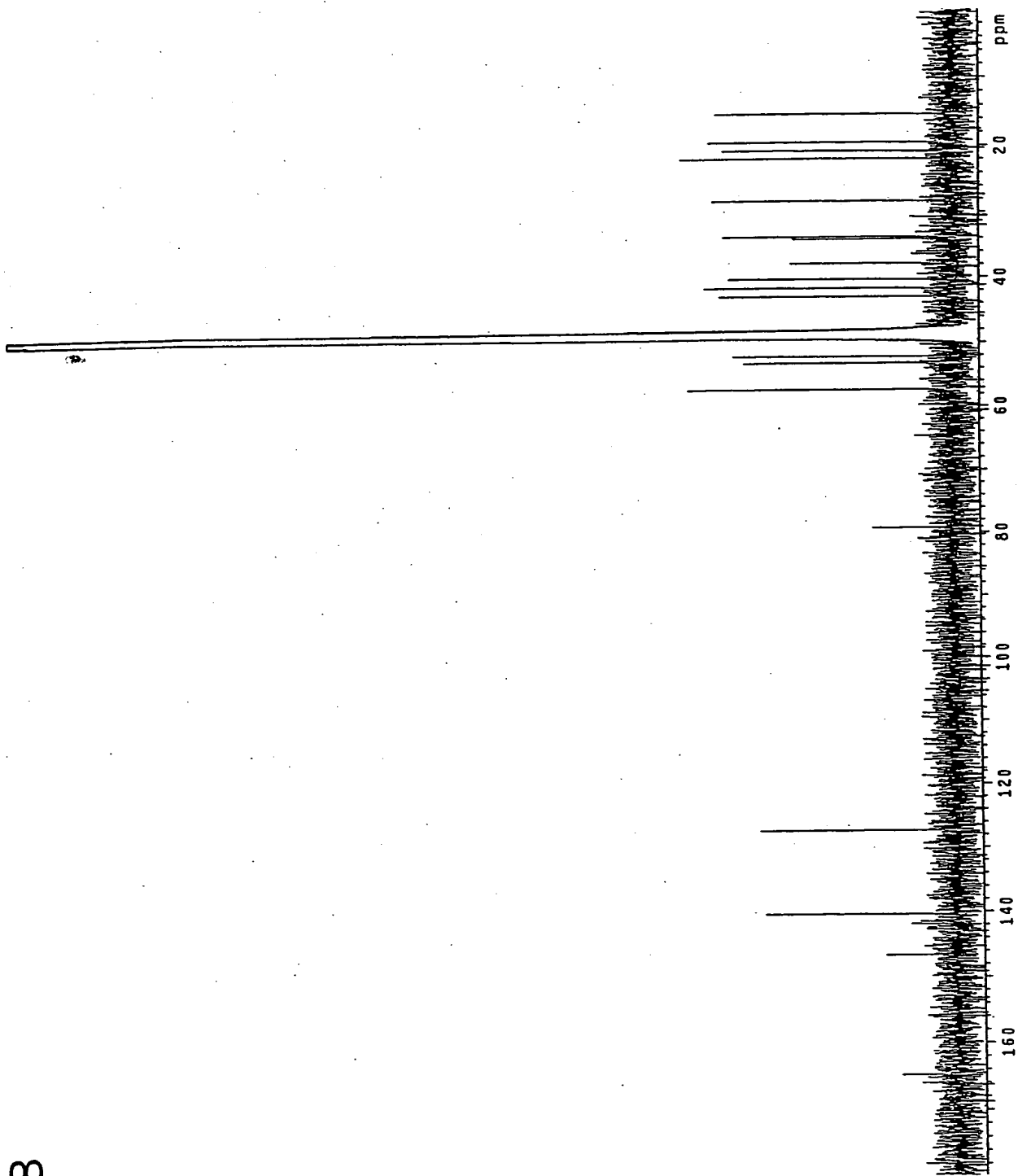


图7



8



6X9

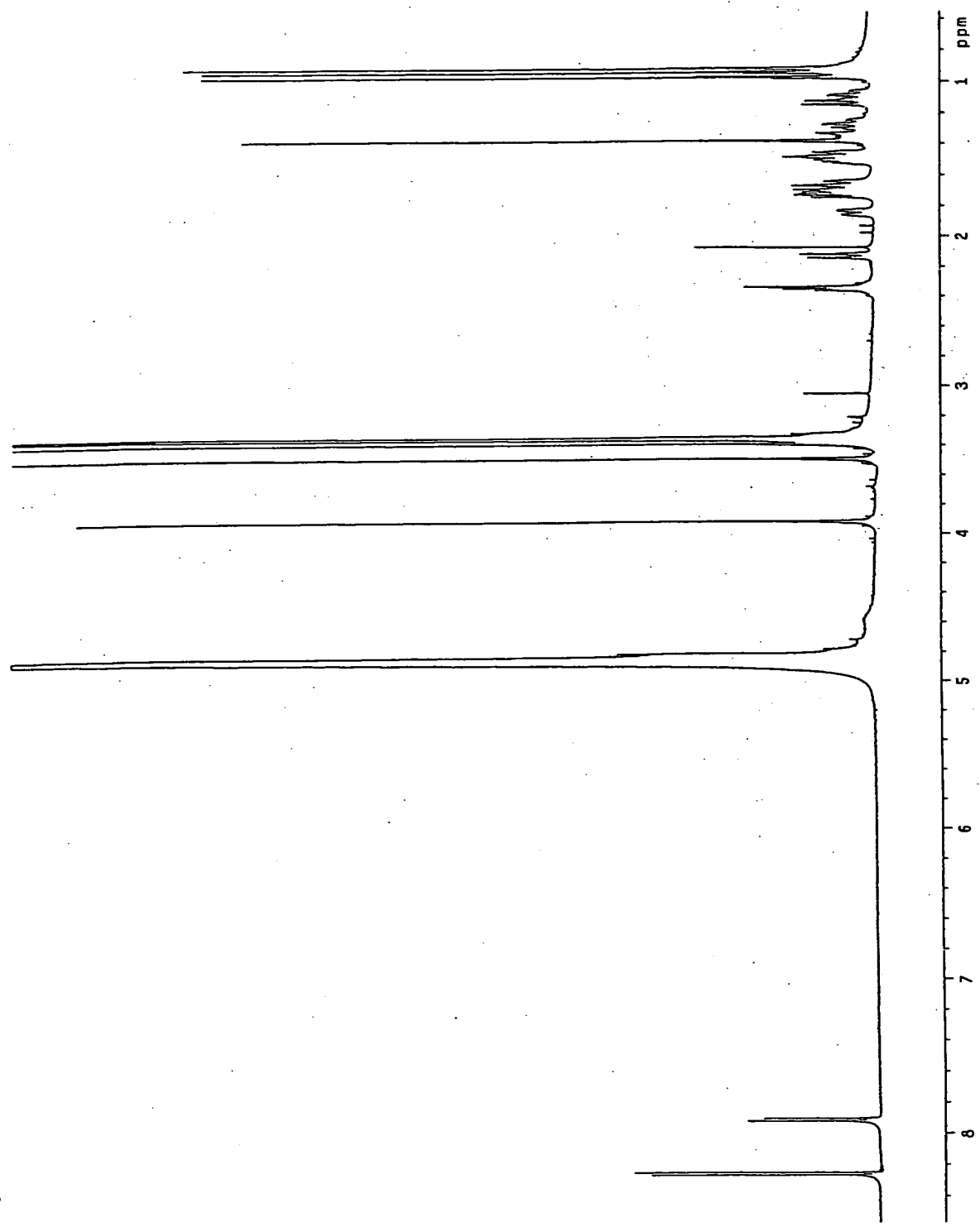


图10

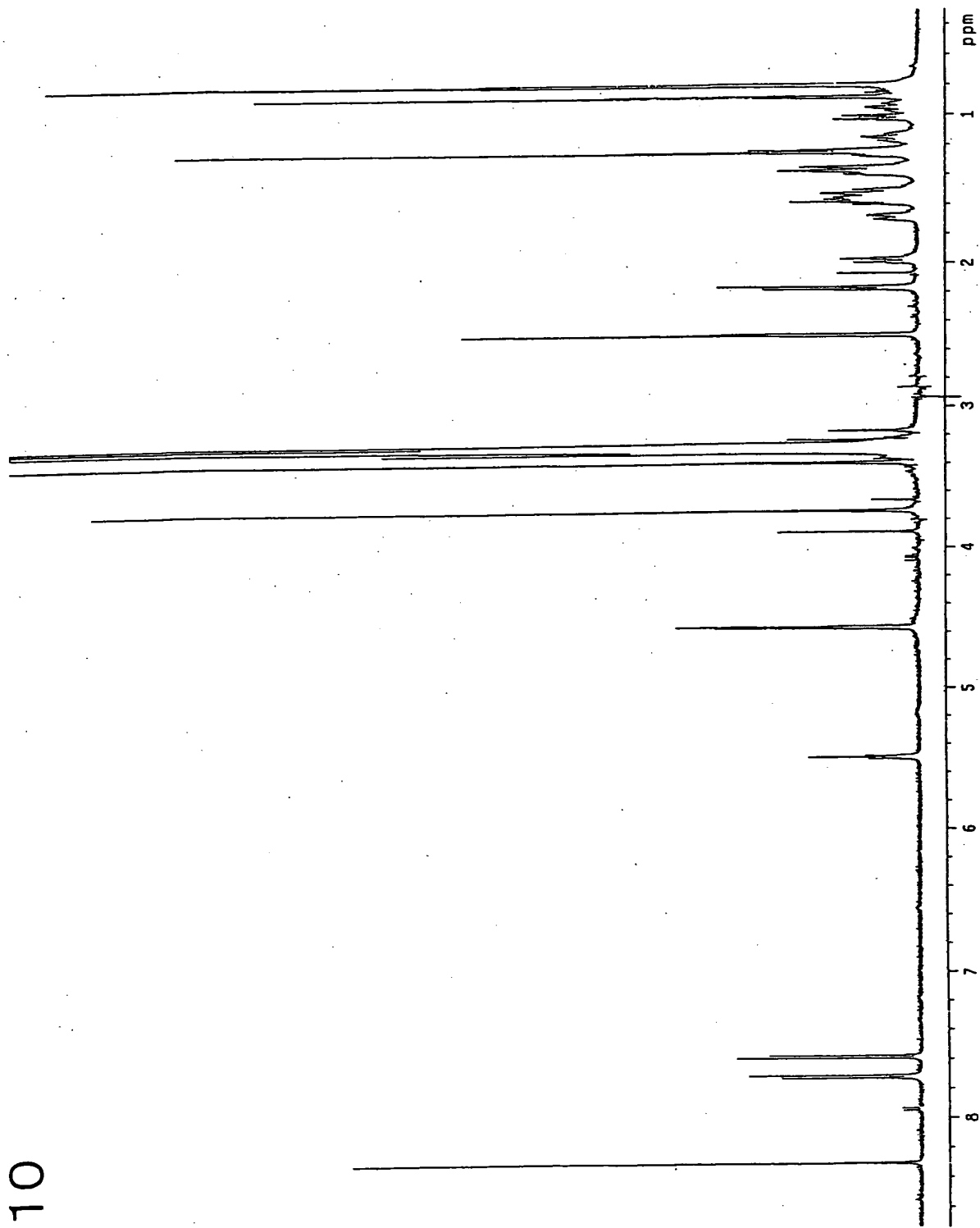


图 11

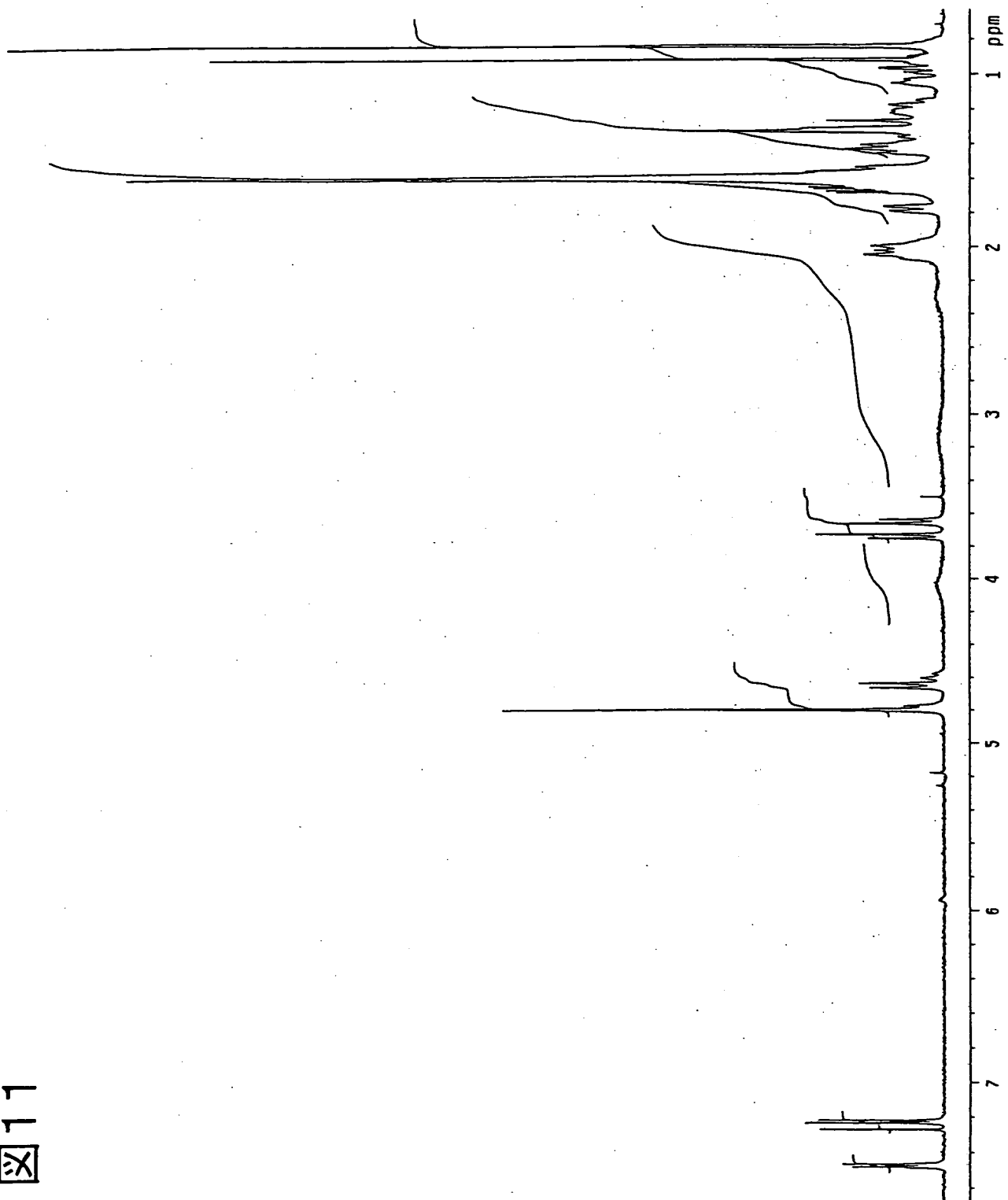


图12

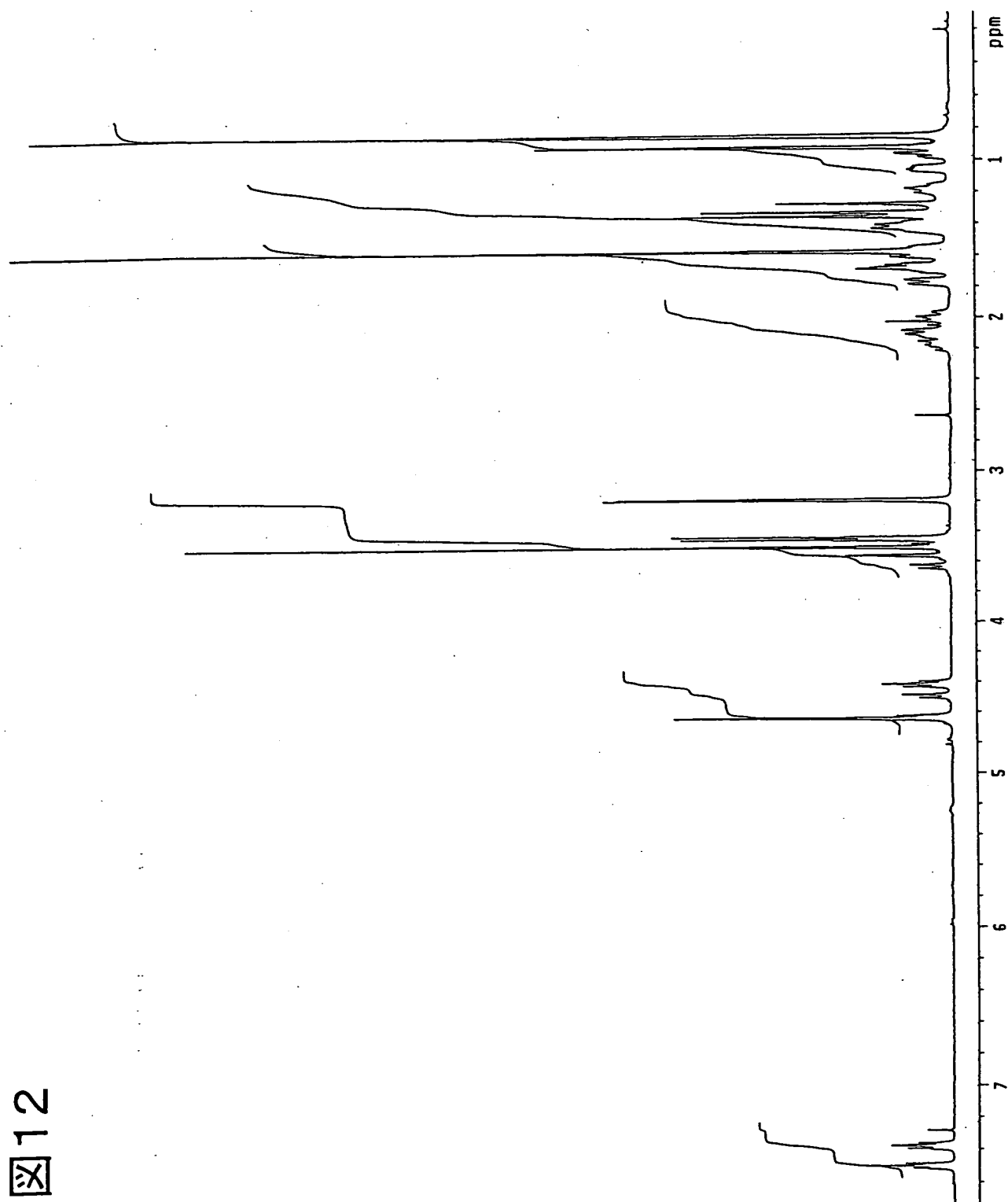
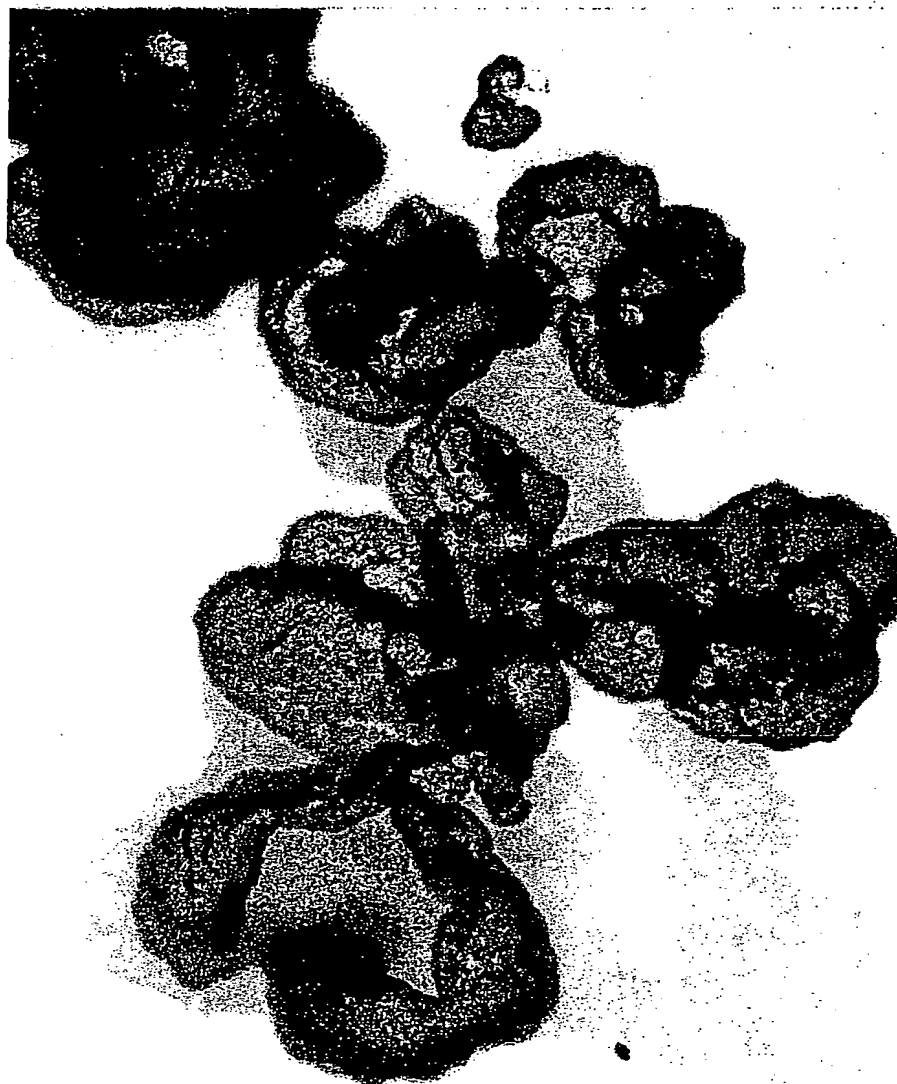


図13



50 μ m

図14



50 μ m

図15

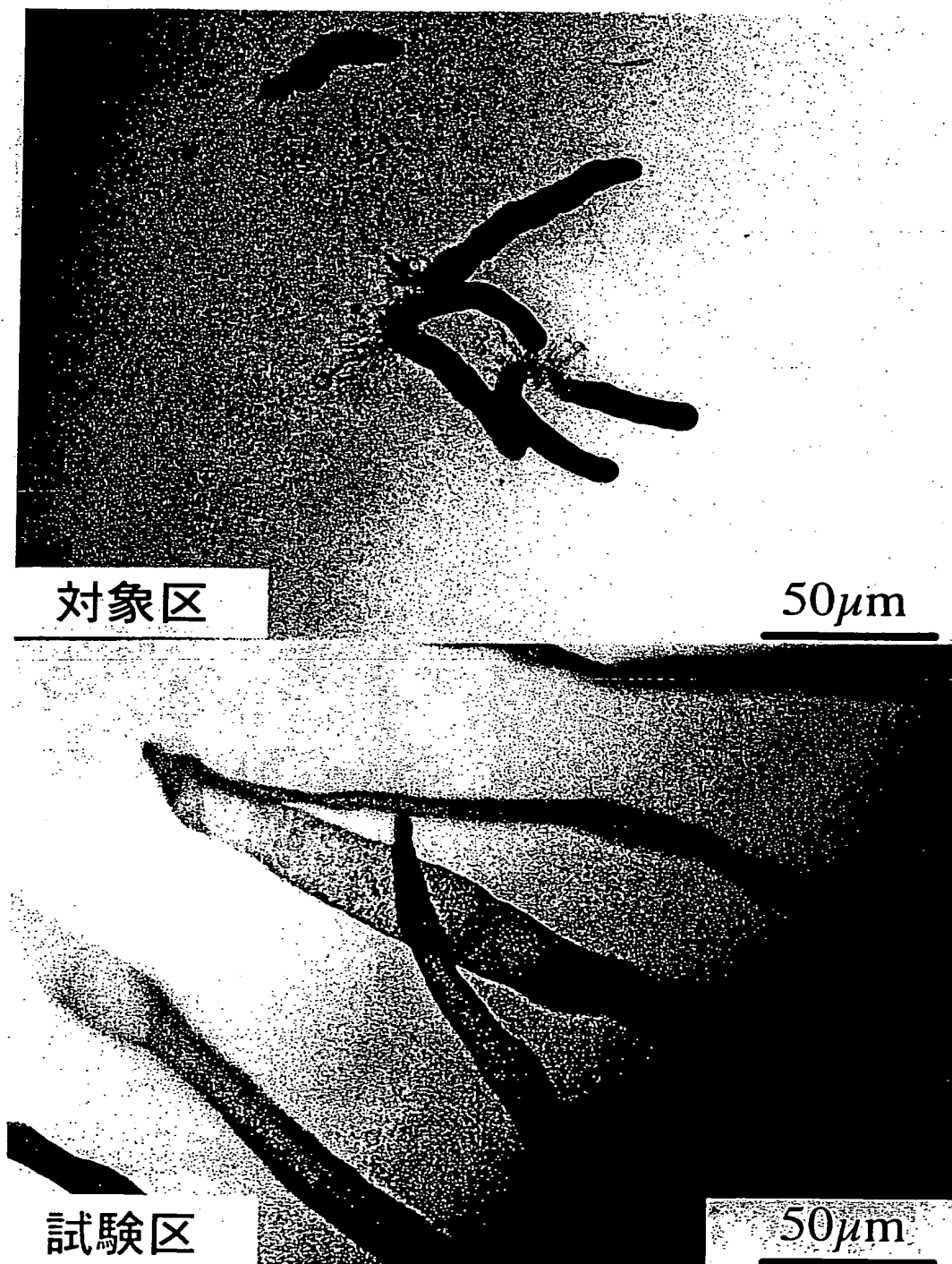
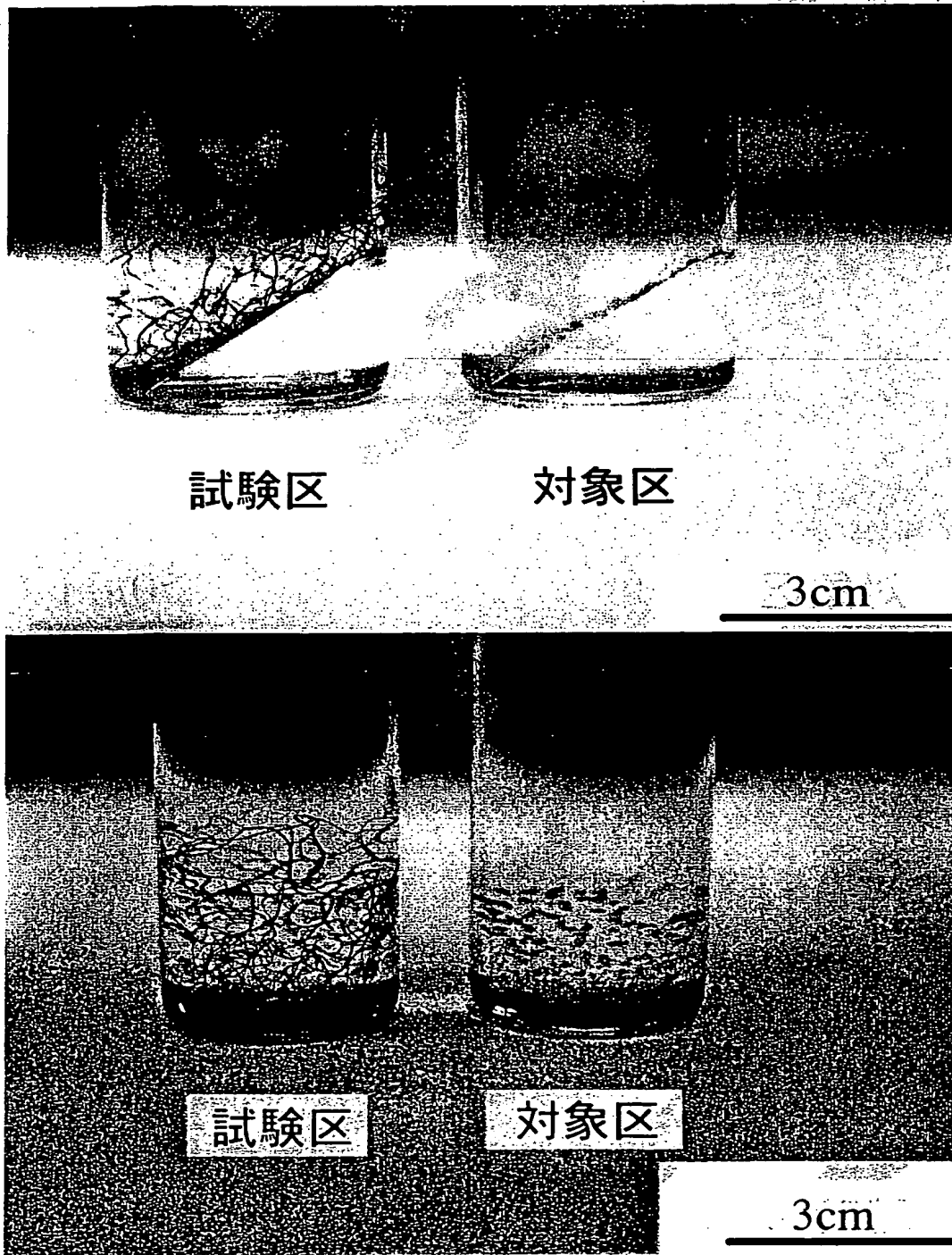
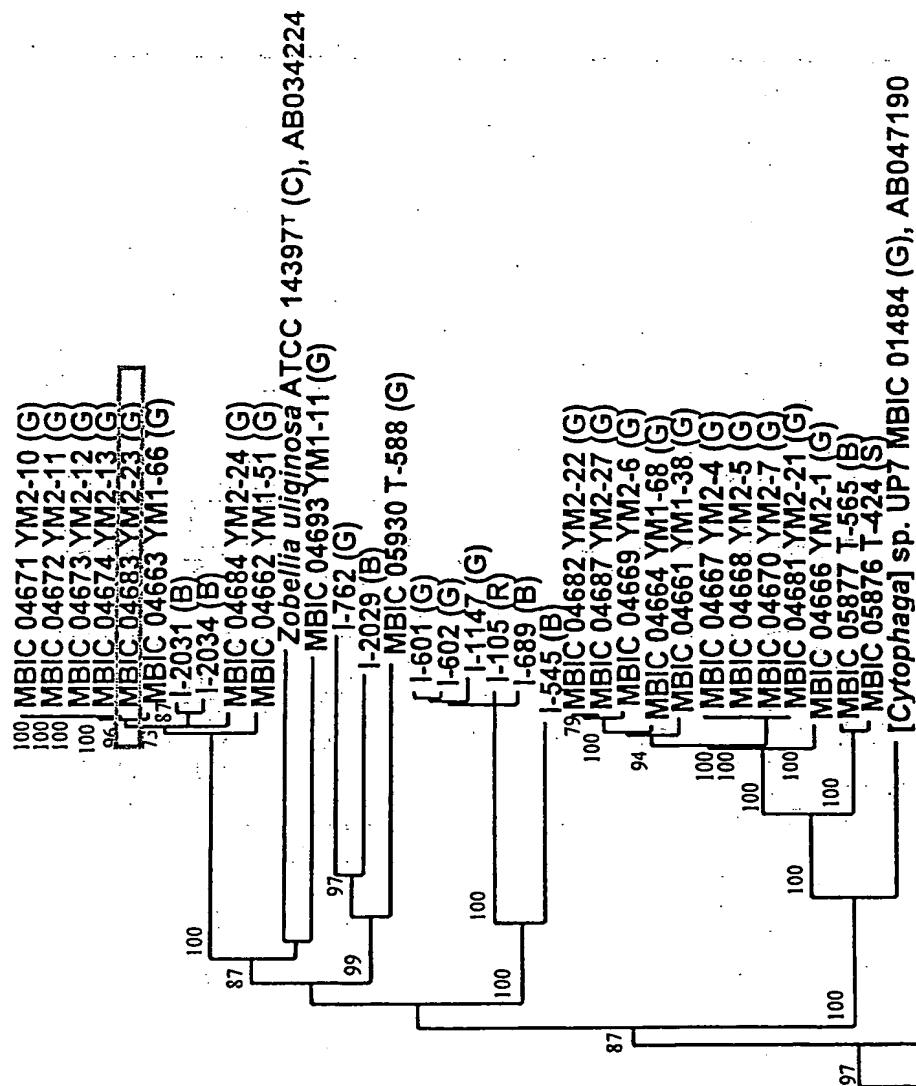


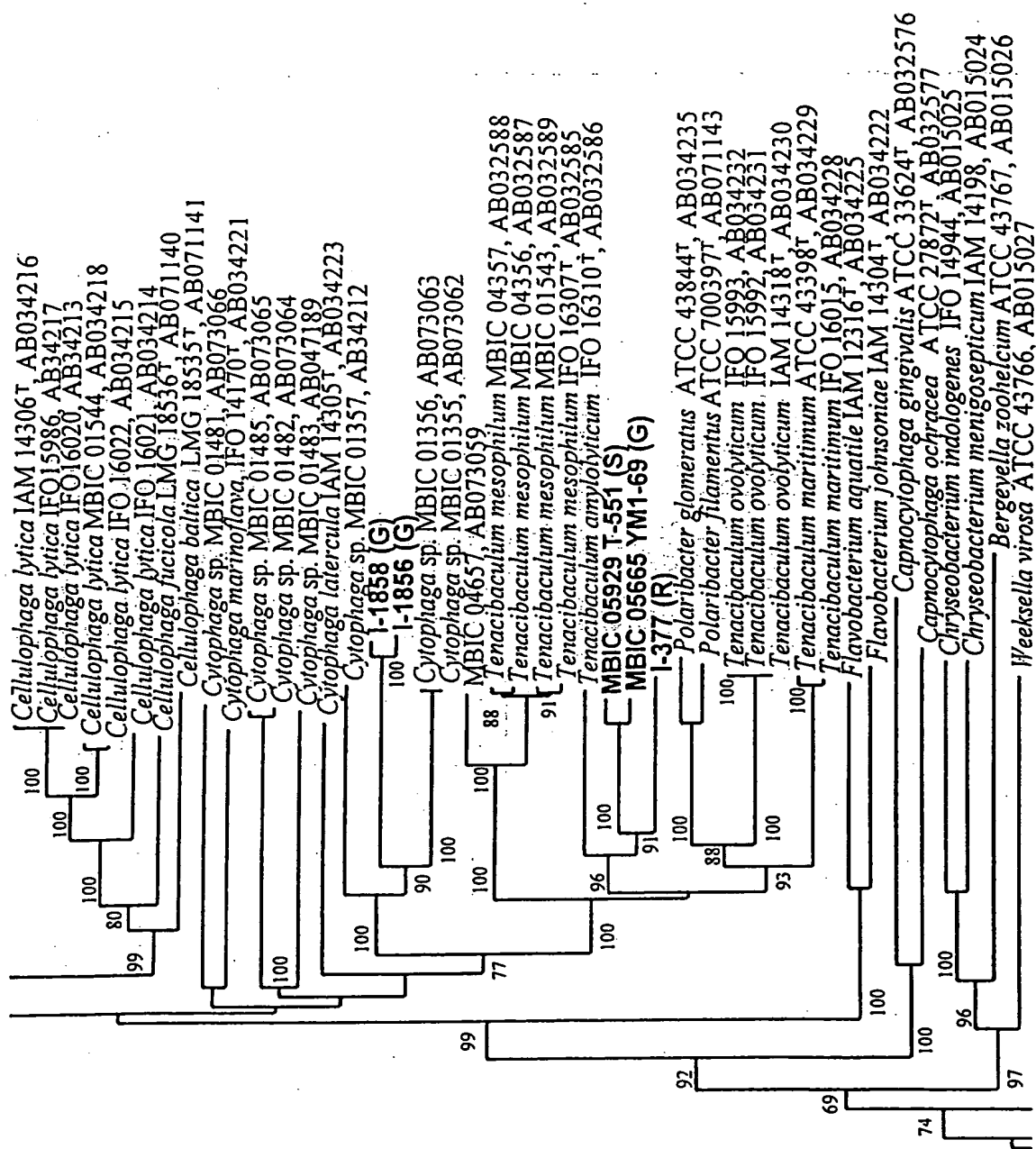
図16

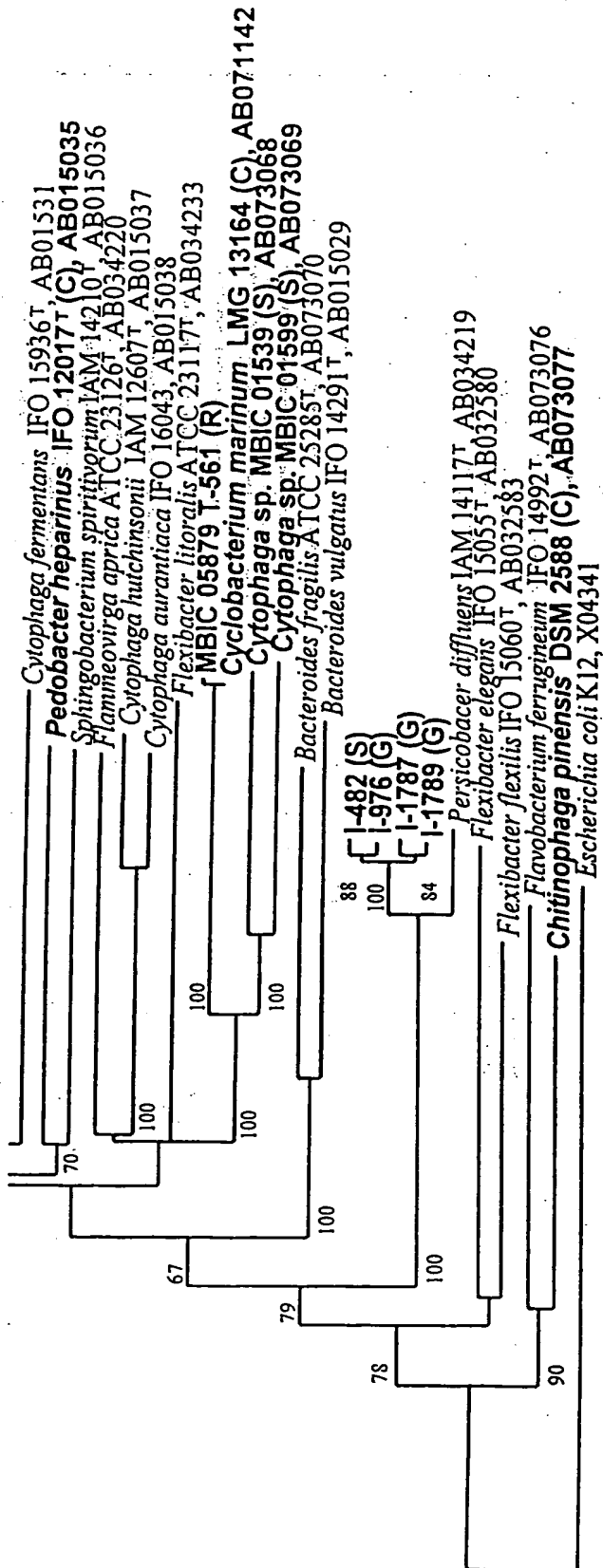


gyrB DNA
1143-1191 bp

A vertical scale bar with the number 0.1 centered next to it.



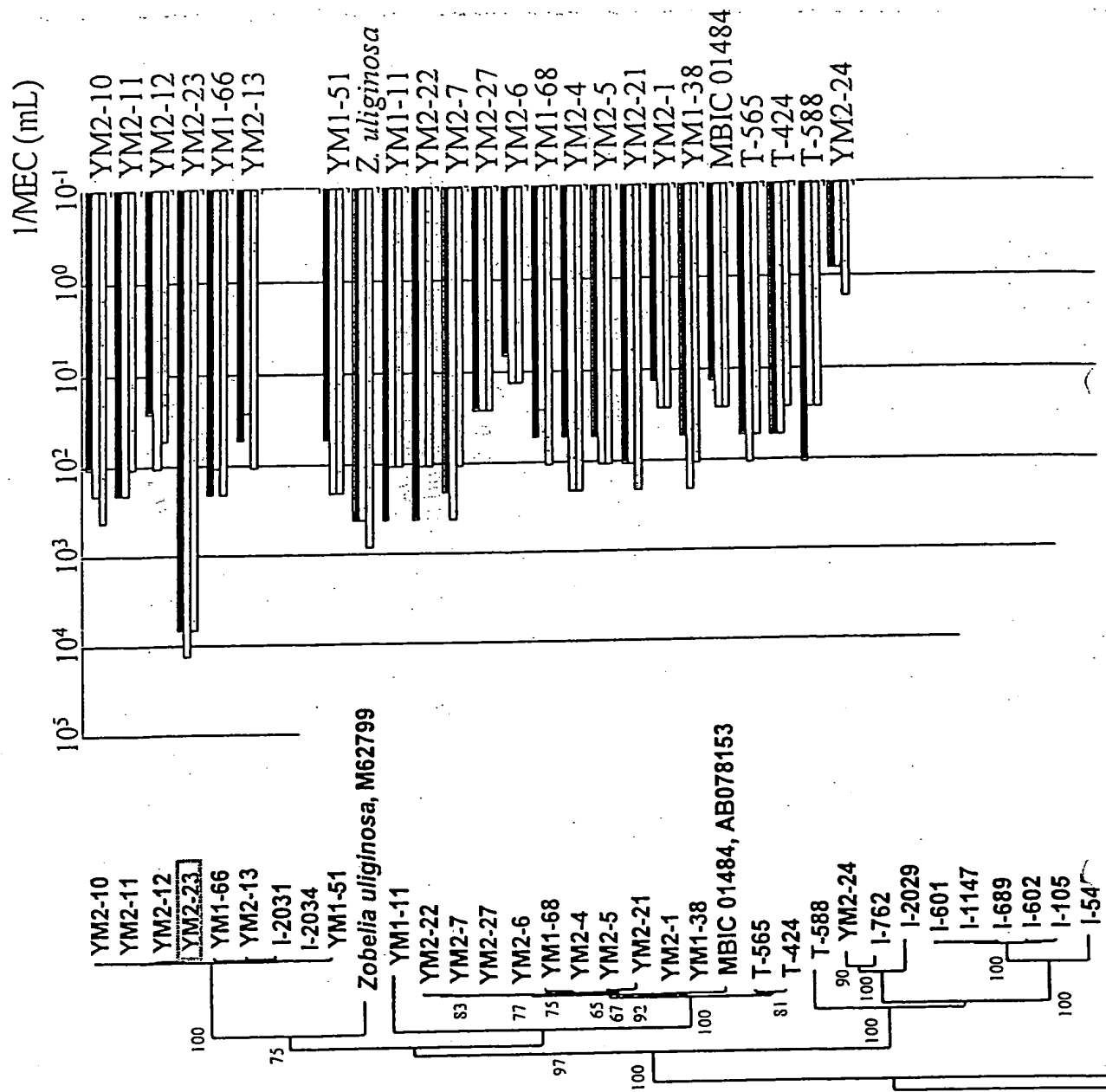




18

16S rDNA
1382-1408 bp

0.1



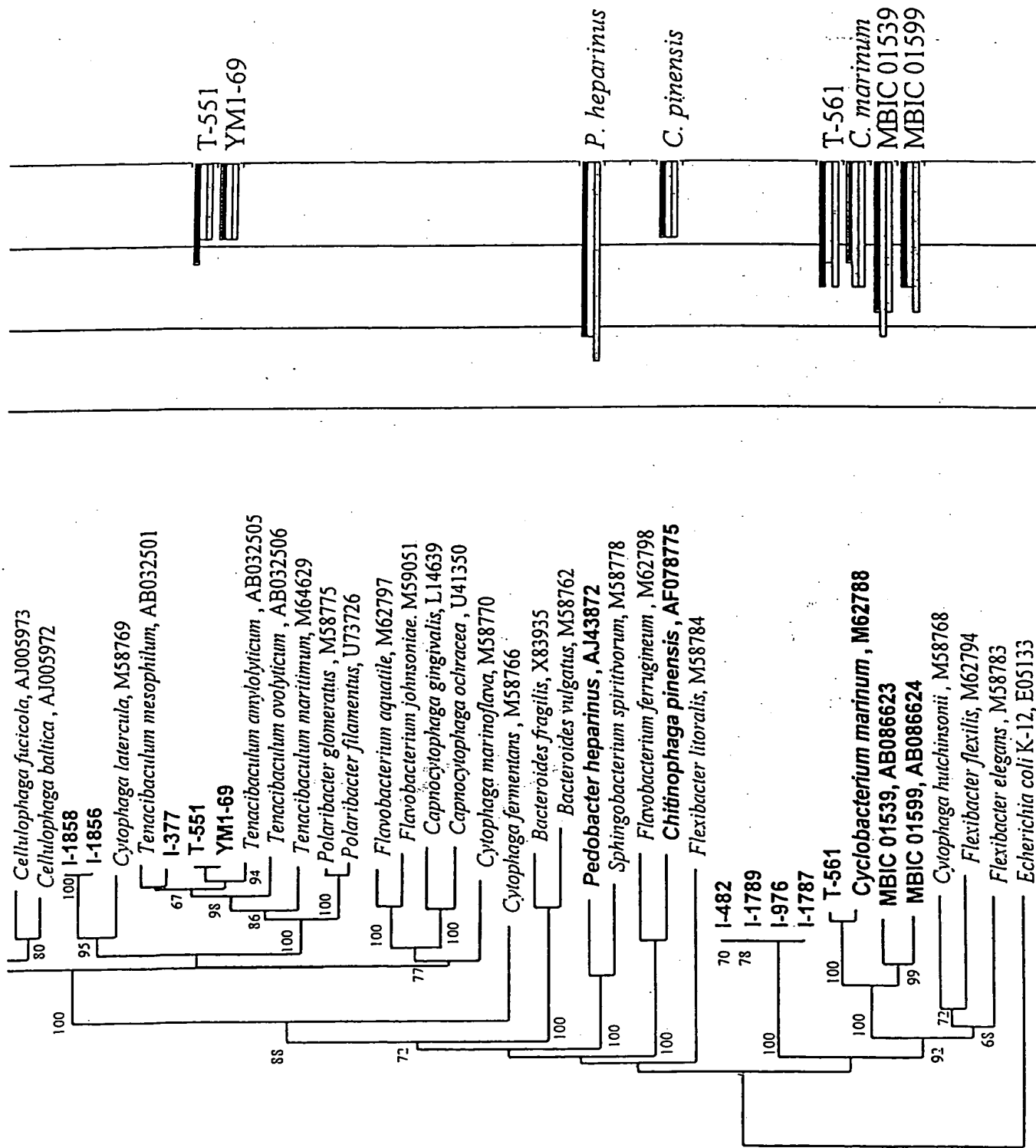


图 19

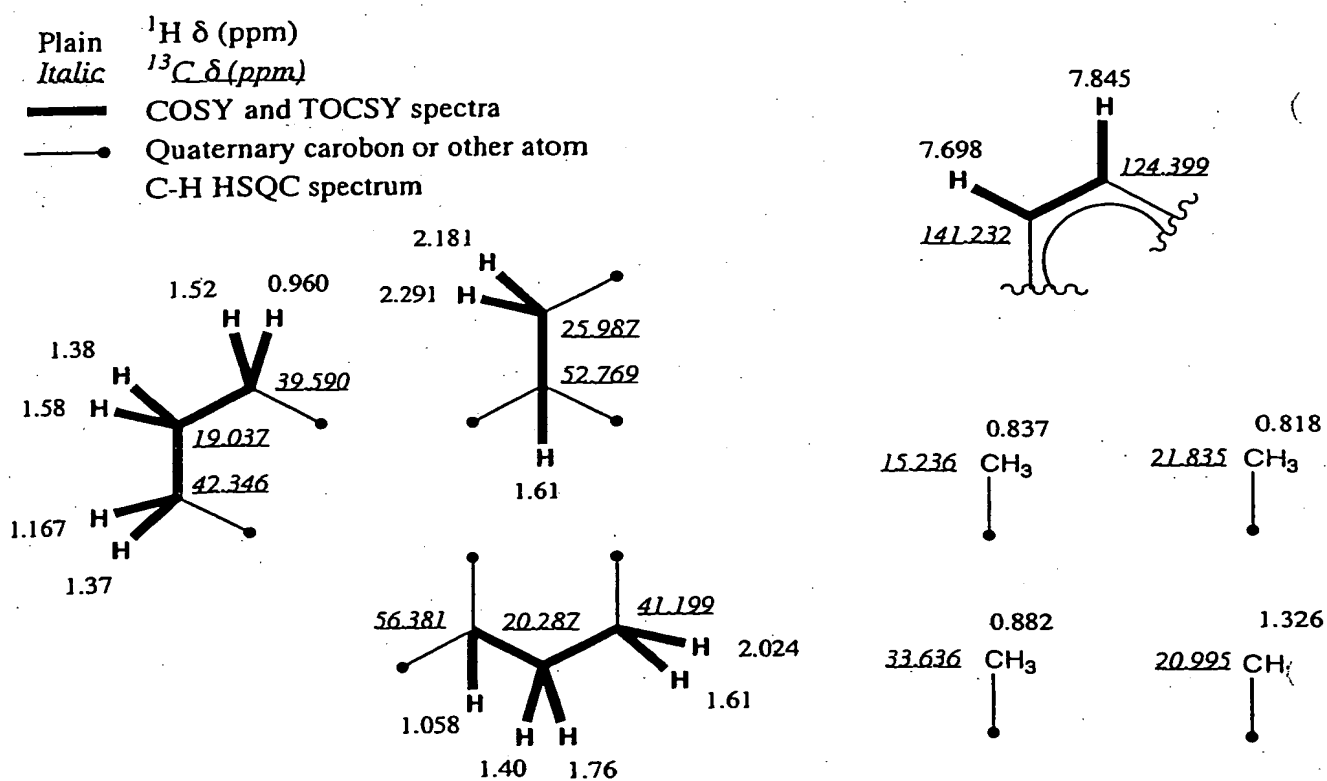


図20

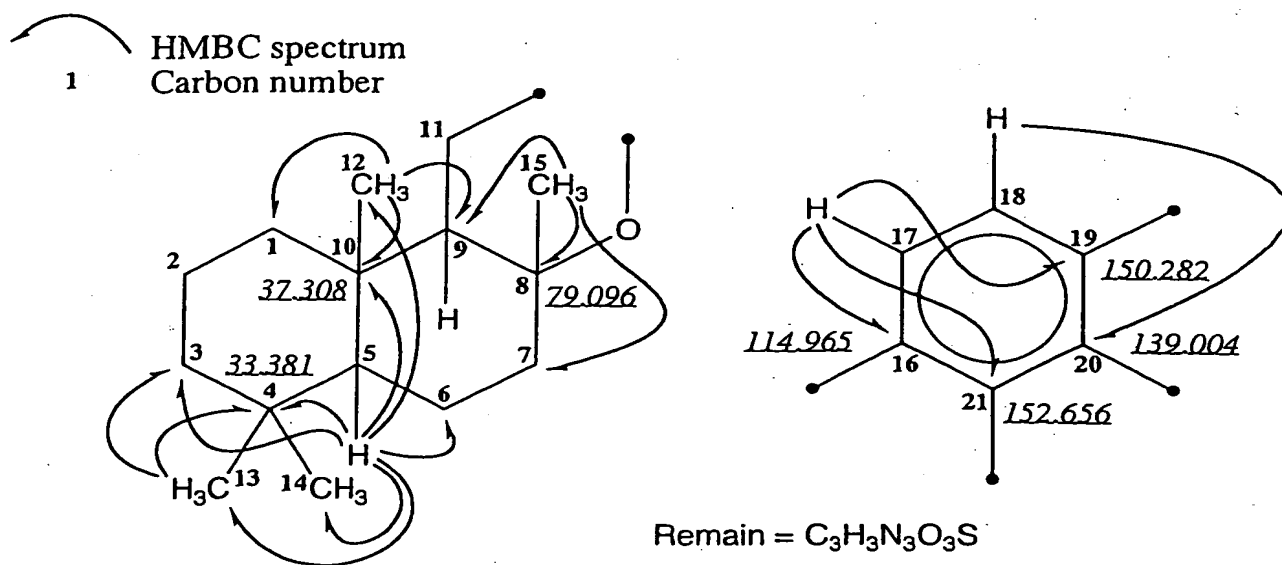


図21

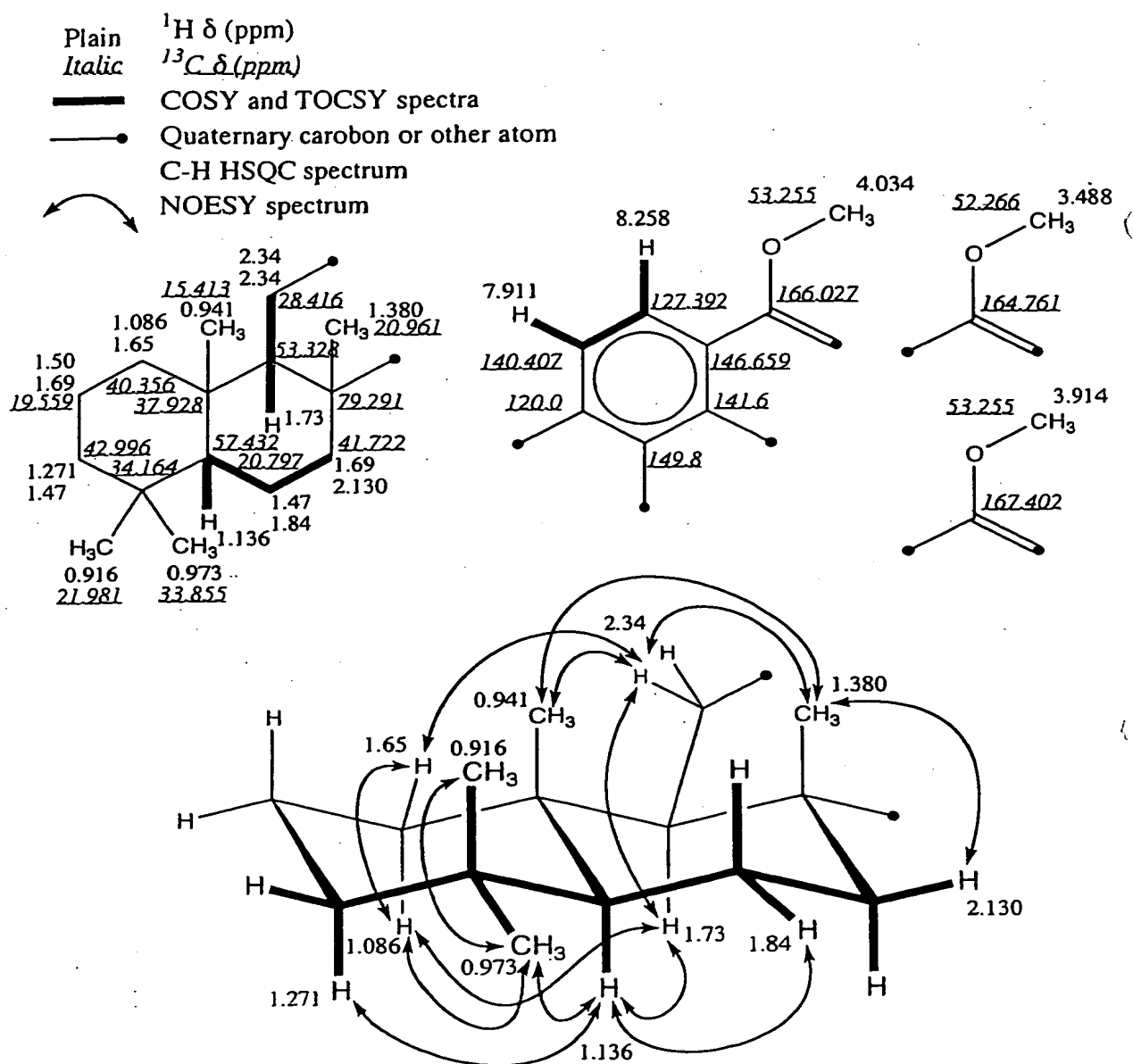


图22

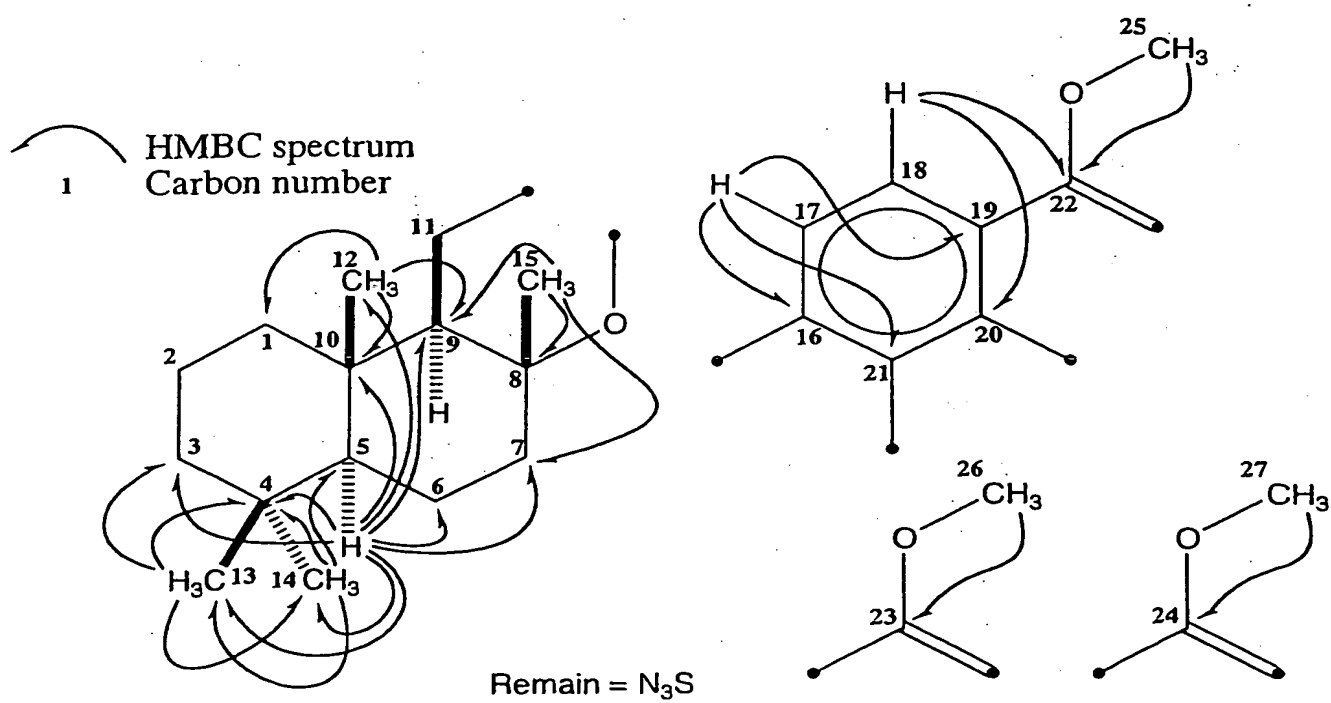


図23

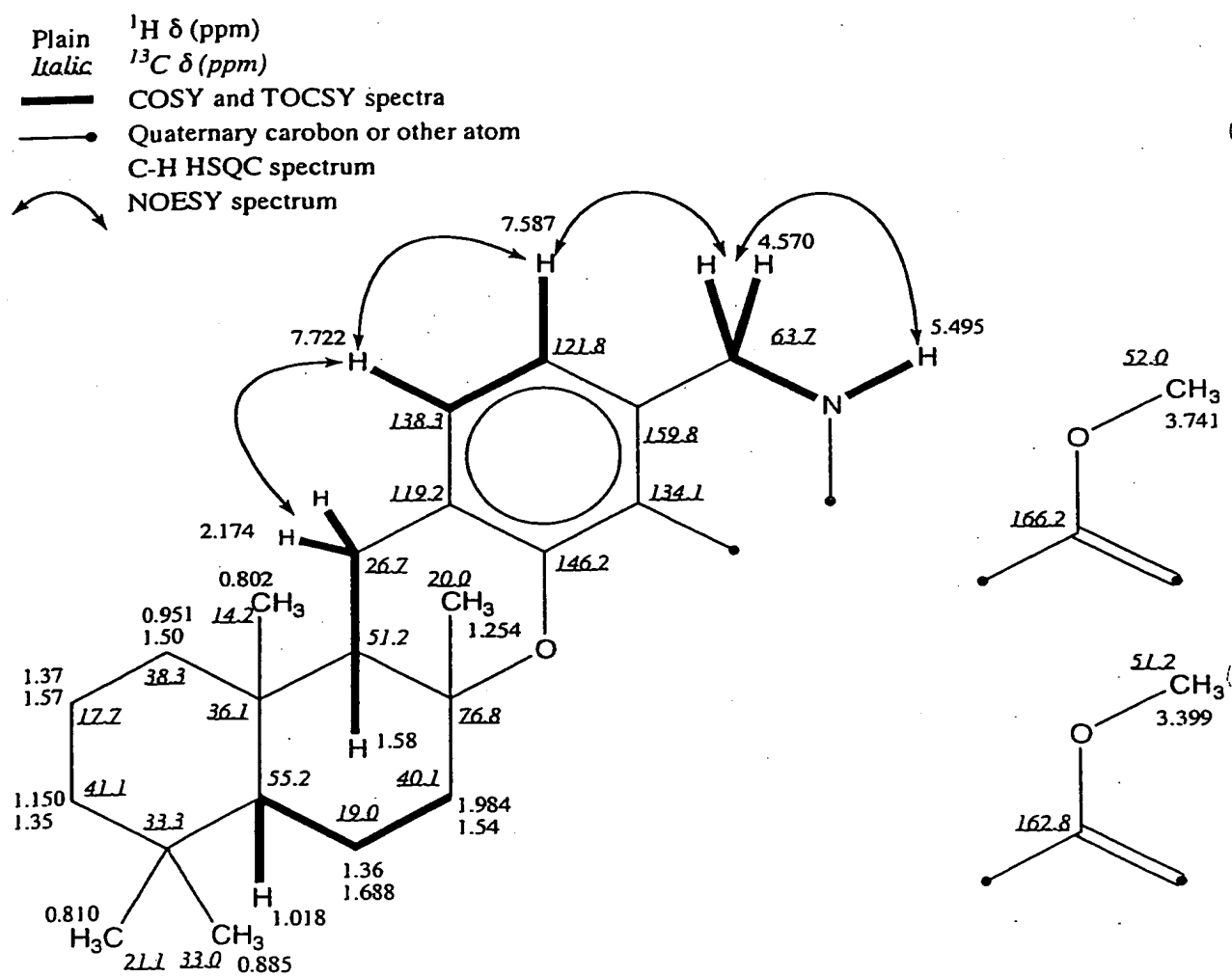


图 24

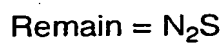


图25

Plain ^1H δ (ppm)
Italic ^{13}C δ (ppm)
— COSY and TOCSY spectra
—• Quaternary carbon or other atom
— C-H HSQC spectrum

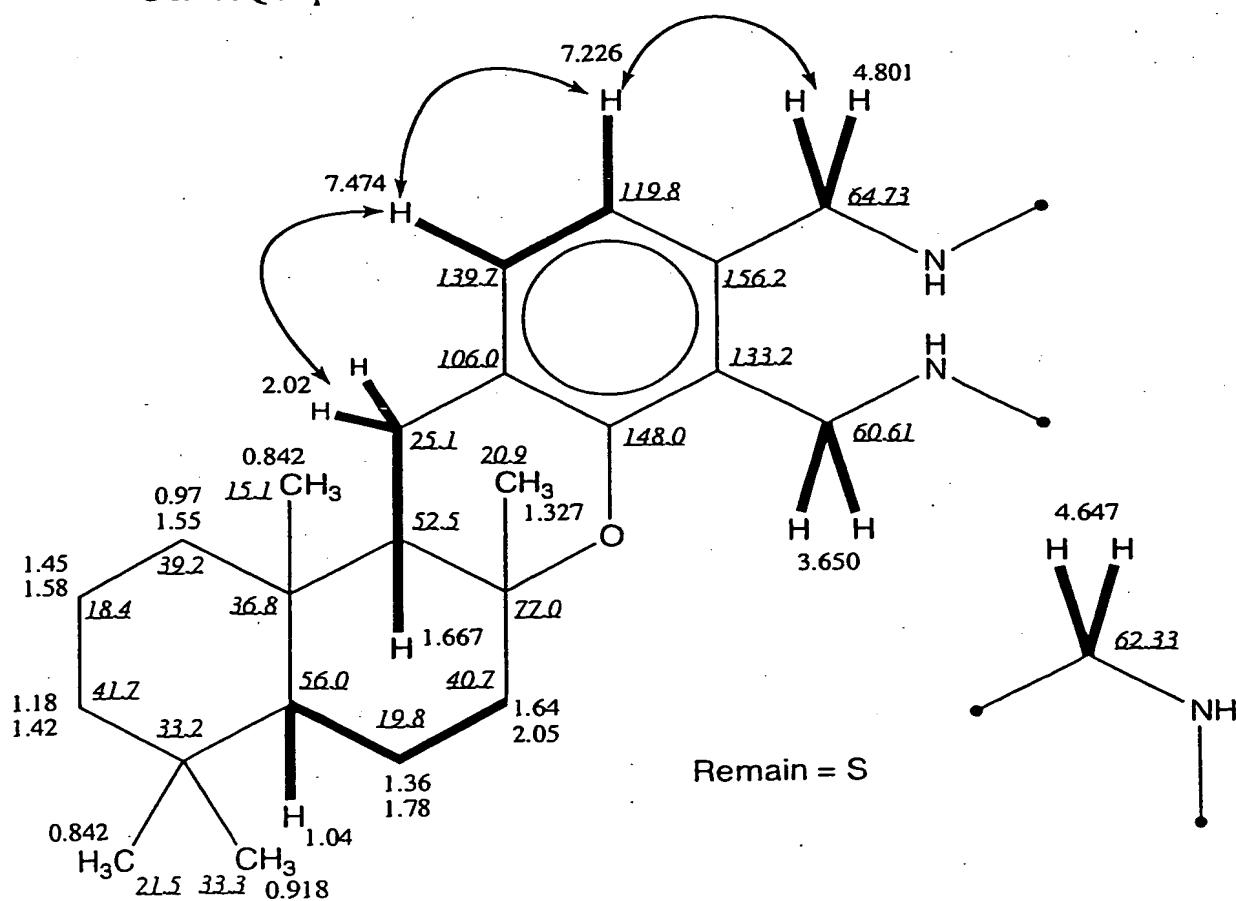
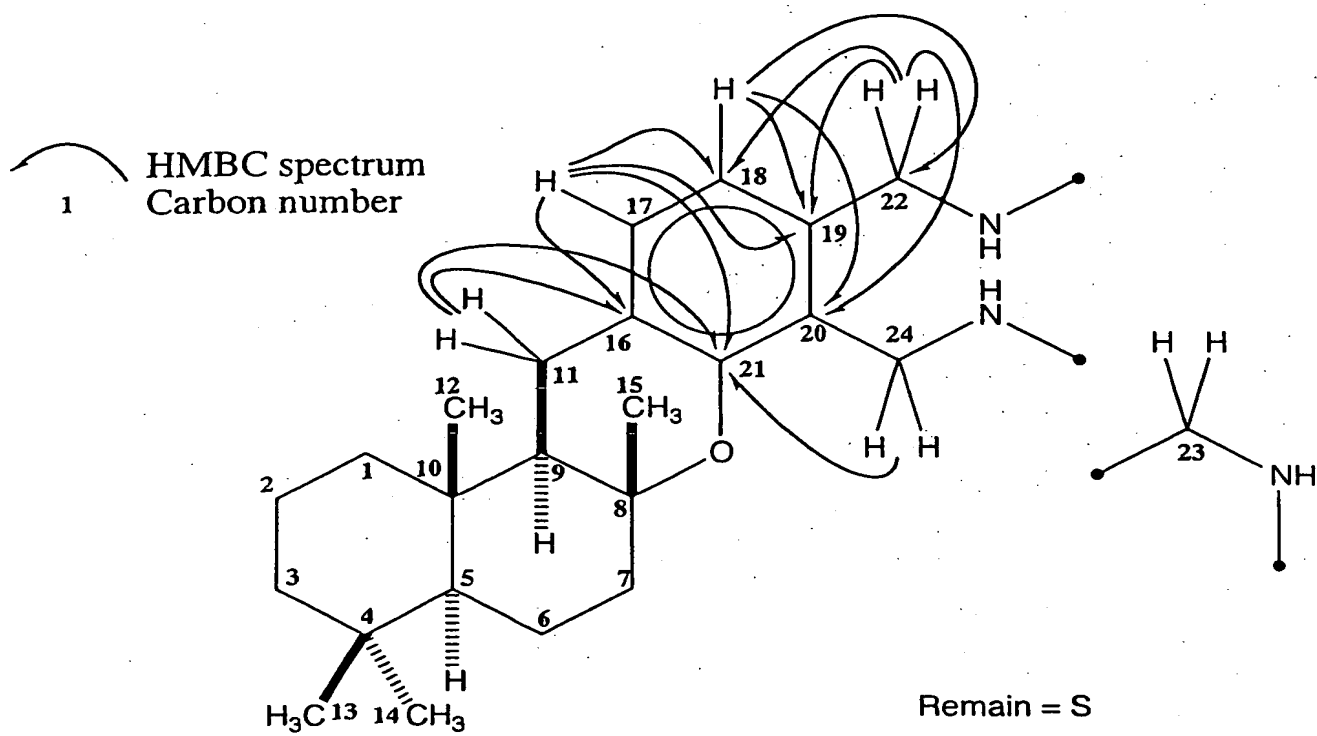


图26

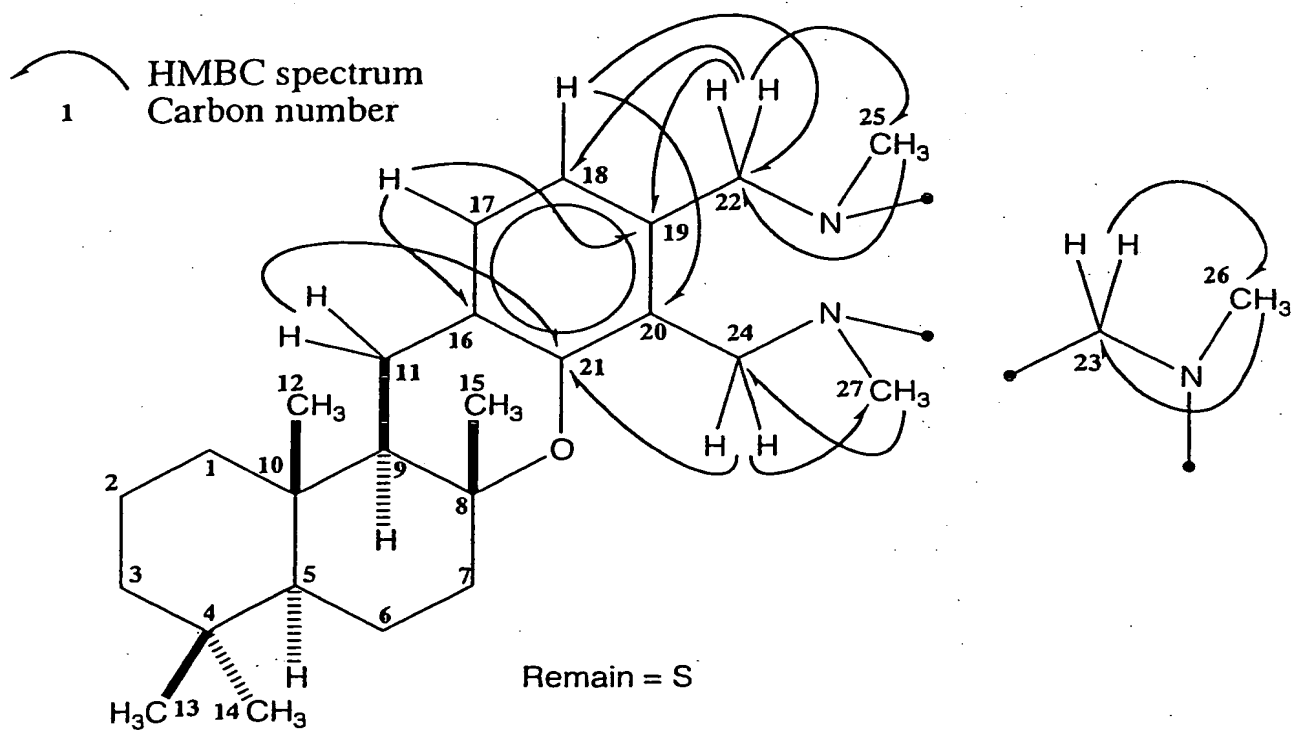


— — — — —

(



图28



SEQUENCE LISTING

<110> MARINE BIOTECHNOLOGY INSTITUTE CO., LTD.

<120> NOVEL CHEMICAL SUBSTANCE HAVING MORPHOGENETIC AND GROWTH-ACCELERATING
ACTIVITIES

<130> PH-1841-PCT

<150> JP2002/203608

<151> 2002-7-12

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 190

<212> DNA

<213> *Tenacibaculum* sp.

<400> 1

```
CCTACGGGAG GCAGCAGTGA GGAATATTGG TCAATGGAGG CAACTCTGAA CCAGCCATGC 60
CGCGTGTAGG AAGACTGCCC TATGGGTTGT AAATACTTT TATATGGGAA GAAACCCCTC 120
TTACGTGTAG AGGCTTGACG GTACCATAAG AATAAGCACC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG 180
CCGCGGTAAT 190
```

<210> 2

<211> 189

<212> DNA

<213> Unknown

<400> 2

CCTACGGGAG GCAGCAGTGA GGAATATTGG ACAATGGGCG GGAGCCTGAT CCAGCCATGC 60
CGCGTGCGGG AAGAAGGCCC TATGGGTCGT AAACCGCTTT TATACGGGAA GAAACCACCC 120
TACGTGTAGG GTACTGACGG TACCGTAAGA ATAAGGACCG GCTAACTCCG TGCCAGCAGC 180
CGCGGTAAT 189

<210> 3

<211> 1173

<212> DNA

<213> *Tenacibaculum* sp.

<400> 3

GTATCTGGAG GTTTACACGG AGTTGGTGTA TCTTGTGTGA ATGCACTTTC AGATCATTTA 60
AAAGCTACAG TTCACAGAGA AGGTAAAATA TGGAACAAG AGTATGAACG TGGTAAAACA 120
CTTTATCCTG TAAAACTGT AGGTGAAACT GATATAACTG GTACAGAAGT AACTTTCTTA 180
CCAGACAAAA GTATTTTCCA ACAAACCACA GAATATAATT ACGAAACGTT AGCTACACGT 240
ATGCGTGAGT TAGCGTATCT TAATAAAGGA ATCACGATTA CGTTAACAGA TAAGCGTAAT 300
AAAGATGATG AAGGAAATTT TATTGCTGAA ACTTTCCACA GTAACGAAGG ATTATCTGAA 360
TTTGTTAAAT ATTTAGATAG TACTCGTACT CCTGTTATTC AGCATGTAAT TTCAATGGAA 420
GGTGAGAAAA ACGGAATTCC TGTTGAGGTT GCAATGATTT ATAATGATTC ATATGCTGAA 480
AATTTACATT CTTATGTAAA TAACATTAAT ACTCACGAAG GAGGAACACA TTTATCAGGA 540
TTTAGAAGAG GTTTAACAAG TACTTTAAAG AAATATGCAG ATACTTCTGG ATTACTAAAG 600
AACGTTAAGT TTGAGATTTT TGGAGATGAT TTCCGTGAAG GTTTAACGGC AATTGTATCT 660
GTAAAAGTAG CTGAACCTCA GTTTGAAGGA CAAACAAAAA CAAAATTAGG AAACAGAGAA 720
GTTACTTCTG CAGTATCGCA AGCTGTAGCA GAAATGTAA CTGATTATTT AGAGGAAAAT 780
CCTAATGATG CTAAAACGAT TGTACAAAAA GTAATTCTTG CAGCTCAAGC GCGTCACGCA 840

GCTCGTAAAG CAAGAGAAAT GGTGCAACGT AAAACAGTAA TGAGTATTGG AGGTTTACCT 900
 GGTAACATAT CTGATTGTTC TGAACTGAT CCAGCAGTTT GTGAAATTTT CTTAGTCGAG 960
 GGAGATTCGG CAGGTGGAAC TGCAAAACAA GGTCTGTATC GTAATTTCCA AGCAATTTTA 1020
 CCCTTACGTG GTAAGATTCT TAACGTAGAA AAAGCGATGC AGCATAAAGT TTTTGAGAAT 1080
 GAAGAAATCA AAAACATGTT TACGGCTTTA GGAATCACTA TCGGAACAGA AGAAGATCCA 1140
 AGAGCATTAA ACTTATCAAA ATTAAGATAT CAT 1173

<210> 4

<211> 1173

<212> DNA

<213> Unknown

<400> 4

GTATCCGGTG GTTTGCACGG GGTAGGTGTT TCTTGTGTGA ACGCCCTTTC CAATCATCTT 60
 AAAGCTACCG TACATAGAGA TGGGAAAGTT TGGGAACAGG AATATGAACG GGGTAAATCC 120
 CTTTATCCCG TAAAAAGTGT TGGGGAGACC GATGAAACTG GAACCATTGT TACCTTCATA 180
 CCAGATGATT CAATCTTTAC CCAAACAACA GAGTATAGTT ATGAGACCCT TGCCAACAGA 240
 ATGCGTGAGC TTTCGTTCTT GAACAAAGGG GTTACCATTG GCATTACGGA CAAAAGAGTA 300
 AAGGATAAAG AAGGGGAGTA CCTTTCTGAA ACTTTTTATT CCGATGCTGG ACTAAGTGAA 360
 TTTGTAAAGT TCTTGGATGG TACCCGTGAA CCTTTGATTC AAGGGGTTAT CGCGATGGAA 420
 GGGGAGAAAA ATGGTATCCC TGTGGAAGTG GCAATGGTTT ACAACACCAG TTACACGGAG 480
 AATTTACATT CCTATGTGAA TAACATTAAC ACGCACGAAG GGGGTACGCA TCTTTCCGGT 540
 TTTAGAAGGG GATTGACCTC TACTTTAAAG AAATACGCAG ATTCTTCTGG AATGCTCGAG 600
 AAATTGAAGT TTGAGGTTCA GGGAGATGAT TTCCGTGAAG GACTTACAGC AATTGTTTCC 660
 GTTAAGGTCG CAGAACCTCA ATTTGAAGGT CAGACGAAAA CCAAGCTTGG AAACCGCGAG 720
 GTTTCTTCTG CGGTGAGCCA AGCTGTTTCT GAAATGCTCA CGGATTATTT GGAGGAGCAT 780
 CCAGATGATG CCAAGGTTAT TGTTCAAAAA GTTATCCTTG CCGCTCAGGC CAGACATGCC 840
 GCTACAAAGG CCCGTGAAAT GGTACAGCGT AAGACGGTAA TGAGTATTGG TGGGCTACCT 900
 GGAAAATTGT CCGATTGTTC TGAGCAAGAT CCTGCGCAAT GTGAAGTATT TCTTGTAGAG 960

GGAGATTCTG CAGGTGGTAC GGCAAAAATG GGCCGGGACC GAAAATTTCA GGCCATTCTT 1020
CCACTAAGGG GTAAAATCTT GAAAGTGGA AAAGCCATGC AGCACAAGGT TTTTGAAAAT 1080
GAGGAAATAA AGAATATTTA TACGGCCCTA GGGGTACTA TTGGAACGGA AGAAGATAGT 1140
AAGGCCTTGA ACCTGGAAAA ATTAAGATAT CAT 1173

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.